

中文



STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.C

HOME

ABOUT SIPO

NEWS

LAW & POLICY

SPECIAL TOPIC

CHINA IP NEWS

Title: Neural progenitor cell populations

Application Number	01809662	Application Date	2001.05.16
Publication Number	1429267	Publication Date	2003.07.09

Priority Information

International Classification A61K35/30;A61P25/00;C12N1/36;C12N5/06;C12N15/11;C12Q1/68;G01N33/53

Applicant(s) Name

Geron Corp.

Address

Inventor(s) Name

M.K. Corperter

Patent Agency Code

31100

Patent Agent

chen wenjing

Abstract

The invention provides populations of neural progenitor cells, differentiated neurons, glial cells, and astrocytes. The populations are obtained by culturing stem cell populations (such as embryonic stem cells) in a cocktail of growth conditions that initiates differentiation, and establishes the neural progenitor population. The progenitors can be further differentiated in culture into a variety of different neural phenotypes, including dopaminergic neurons. The differentiated cell populations or the neural progenitors can be generated in large quantities for use in drug screening and the treatment of neurological disorders.

Machine Translation

Close

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/06

C12N 1/36 C12N 15/11

C12Q 1/68 G01N 33/53

A61K 35/30 A61P 25/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01809662. X

[43] 公开日 2003 年 7 月 9 日

[11] 公开号 CN 1429267 A

[22] 申请日 2001.5.16 [21] 申请号 01809662. X

[30] 优先权

[32] 2000. 5. 17 [33] US [31] 60/205,600

[32] 2000. 12. 22 [33] US [31] 60/257,608

[86] 国际申请 PCT/US01/15861 2001.5.16

[87] 国际公布 WO01/88104 英 2001.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.18

[71] 申请人 杰龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·K·卡彭特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

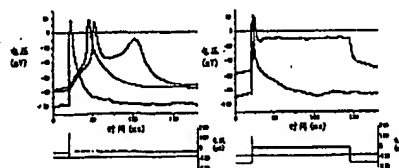
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 6 页

[54] 发明名称 神经祖细胞群体

[57] 摘要

本发明提供了神经祖细胞、分化神经元、神经胶质细胞以及星形胶质细胞的群体。这些群体是通过在启动分化的混合生长条件下培养干细胞群体(如, 胚胎干细胞)获得的, 并建立了神经前体细胞群体。前体细胞在培养物中可以进一步分化, 最终变成各类不同的神经表型, 包括多巴胺能神经元。分化的细胞群体或神经前体细胞可以大量产生, 以使用在药物筛选和治疗神经疾病。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种通过分化灵长类多能干(pPS)细胞获得的在体外培养物中增殖的细胞群体, 其中, 该群体中至少约 30%的细胞能够定向形成神经元细胞、神经胶质细胞
5 或这两种。
2. 一种通过分化灵长类多能干(pPS)细胞获得的在体外培养物中增殖的细胞群体, 包括至少约 60%的神经祖细胞, 其中, 至少 10%的细胞可以分化成神经元细胞, 并有至少 10%的细胞可以分化成神经胶质细胞。
3. 一种通过分化灵长类多能干(pPS)细胞获得的在体外培养物中增殖的细胞群
10 体, 包括至少约 60%的神经祖细胞, 其中, 至少有 10%的细胞表达 A2B5, 并有至少 10%的细胞表达 NCAM。
4. 如权利要求 1-3 所述的细胞群体, 其中, pPS 细胞是人胚胎干(hES)细胞。
5. 如前面权利要求中任何一项所述的细胞群体, 是在培养基中通过分化 pPS 细胞获得的, 培养基中含有至少两种与生长因子受体结合的配体, 受体选自 EGF、
15 bFGF、PDGF、IGF-1 以及对这些配体的受体的抗体。
6. 如前面权利要求中任何一项所述的细胞群体, 是通过在含有生长因子的培养基中分化 pPS 细胞, 并根据 NCAM 或 A2B5 的表达对分化的细胞进行分选, 然后再收集分选的细胞而获得的。
7. 如前面权利要求中任何一项所述的细胞群体, 可被诱导产生至少有 30%的细
20 胞具有成熟神经元的形态学特征并且是 NCAM 阳性的细胞群体。
8. 如权利要求 7 所述的细胞群体, 其中有成熟的神经元形态学特征的细胞至少有
以下特征中的三项:
 - a) 当施用乙酰胆碱时至少 60%的细胞显示出钙流;
 - b) 当施用 GABA 时至少 60%的细胞显示出钙流;
 - 25 c) 当施用去甲肾上腺素时至少 10%的细胞显示出钙流;
 - d) 当外部钾离子浓度为 50mM 时至少 60%的细胞显示出钙流; 或者
 - e) 当在全细胞膜片钳装置中受到刺激时, 至少 25%的细胞被证明有动作电位。
9. 如前面权利要求中任何一项所述的细胞群体, 可被诱导产生至少有 1%的细胞对酪氨酸羟化酶染色呈阳性的细胞群体。
- 30 10. 一种含有至少 60%神经祖细胞和/或成熟神经元的细胞群体, 与已建立的人胚胎干(hES)细胞系有相同的染色体组。
11. 如权利要求 10 所述的细胞群体, 其中, 神经祖细胞和/或成熟神经元表达

NCAM、A2B5、MAP-2 或 Nestin。

12. 一种含有成熟神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞或其结合的细胞群体，是通过进一步分化如前面权利要求中任何一项所述的细胞群体获得的。

13. 如权利要求 12 所述的细胞群体，包括一个至少有 30% 的细胞具有成熟神经元的形态学特征并且是 NCAM 阳性的亚群，其中的亚群有以下特征：

- a) 当施用乙酰胆碱时至少 60% 显示出钙流；
- b) 当施用 GABA 时至少 60% 显示出钙流；
- c) 当施用去甲肾上腺素时至少 10% 显示出钙流；
- d) 当外部钾离子浓度为 50mM 时至少 60% 显示出钙流；或者
- e) 当在全细胞膜片钳装置中受到刺激时，至少 25% 被证明有动作电位。

14. 如权利要求 12-13 所述的细胞群体，其中至少 1% 的细胞对酪氨酸羟化酶染色呈阳性。

15. 如权利要求 12-14 所述的细胞群体，是通过在含有活化剂 cAMP、神经营养因子或其结合的培养基中培养如权利要求 1-10 中任何一项所述的细胞群体获得的。

16. 一种分离的神经前体细胞，是通过提供如权利要求 1-11 中任何一项所述的细胞群体，并从其中选出具有神经前体细胞特征的细胞而获得的。

17. 一种分离的成熟神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞，是通过提供如权利要求 10-15 中任何一项所述的细胞群体，并从其中分别选出具有神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞特征的细胞而获得的。

18. 如权利要求 17 所述的分离的成熟神经元，是多巴胺能神经元。

19. 如权利要求 18 所述的分离的成熟神经元，是通过在含有活化剂 cAMP、神经营养因子(如，神经生长因子、神经营养蛋白 3 或脑衍生神经营养因子)或其结合的培养基中培养如权利要求 1-11 中任何一项所述的细胞获得的。

20. 如前面权利要求中任何一项所述的细胞或细胞群体，可经遗传转化而表达端粒酶逆转录酶。

21. 一种获得神经前体细胞的方法，其中的神经前体细胞能够产生至少 1% 为酪氨酸羟化酶阳性细胞的细胞群体，这一方法包括分化人胚胎干细胞。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中的分化处理包括在含有至少两种可与生长因子受体相结合的配体的培养基中进行培养，受体选自 EGF、bFGF、PDGF、IGF-1 以及对这些配体的受体的抗体。

23. 一种获得至少 1% 为酪氨酸羟化酶阳性细胞的细胞群体的方法，包括分化人

胚胎干(hES)细胞。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 包括获得如权利要求 19 所述的神经前体细胞, 然后将获得的细胞培养在含有活化剂 cAMP、神经营养因子(如, 神经生长因子、神经营养蛋白 3 或脑衍生神经营养因子)或其结合的培养基中。

- 5 25. 一种筛选对神经细胞有毒性或调节作用的化合物的方法, 包括制备含有该化合物的培养物, 以及如权利要求 1-20 中任何一项所述的细胞群体或分离的细胞; 确定因与该化合物接触而导致细胞中发生的任何表型或代谢变化; 并将这种变化与神经细胞的毒性或调节性相关联。

26. 一种获得聚核苷酸的方法, 聚核苷酸中含有在神经祖细胞中高度表达的
10 mRNA 的核苷酸序列, 这一方法包括:

a) 在如权利要求 1-15 所述的细胞群体中确定多种 mRNA 在一个或多个细胞中的表达水平;

b) 对照在较成熟细胞中的表达状况, 从细胞群体中鉴别出在细胞中以较高水平表达的 mRNA; 并且

- 15 c) 制备聚核苷酸, 其核苷酸序列由从步骤 b) 选出的 mRNA 中所含的至少 30 个连续的核苷酸组成。

27. 一种含有如权利要求 1-20 中任何一项所述的细胞群体或分离的细胞的药物, 可通过外科或内科治疗用于人体或动物体。

28. 在药物制造方面应用如权利要求 1-20 中任何一项所述的细胞群体或分离的
20 细胞, 以用来重建或补偿个体中枢神经系统(CNS)机能。

神经祖细胞群体

技术领域

- 5 本发明一般涉及胚胎细胞和神经祖细胞的细胞生物学领域。具体地说，本发明涉及采用特殊的培养条件和筛选技术，使人类多能干细胞定向分化成神经细胞和神经胶质细胞谱系。

相关申请资料

- 10 本申请要求提交于 2000 年 5 月 17 日的美国临时专利申请 60/205, 600 号；以及提交于 2000 年 10 月 22 日的 60/257, 608 号的优先权。为在美国依法实施，在此全文并入这些在先申请以供参考。

背景技术

- 15 中枢神经系统的修复是一项医学界还没有攻克的尖端科学。像阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、癫痫、亨特氏症以及中风对其患者会造成破坏性的后果。对头部或脊髓的损伤可使人立即脱离正常生活而进入残疾人的行列。

对神经系统造成的难以处理的损伤就是经常被证实的不可修复的损伤。对于这种情况，人们主要的愿望就是开发出可重建神经网络并能重新赋予神经系统功能的细胞群体。

- 20 出于这个原因，许多研究都对神经祖细胞产生了巨大的兴趣。到目前为止，一般认为在分化过程的早期就决定了多能神经祖细胞要么分化成神经限制性细胞、要么分化成神经胶质限制性细胞。人们认为，它们依次可产生成熟的神经元或成熟的星形胶质细胞和少突胶质细胞。神经嵴中的多能神经祖细胞同样会分化成神经元、平滑肌和神经膜细胞。据推测，各种谱系限制的祖细胞会自我更新并定位在中枢神经系统中选定的位置上，如脊髓。Kalyani 等的研究文献中综述了发育中的神经管中的细胞谱系(Biochem. Cell Biol, 6:1051, 1998)。

在发育中的脊髓中已鉴定出假定的多能神经上皮细胞(NEP 细胞)。Kalyani 等(Dev. Biol, 186:202, 1997)报道了大鼠中的 NEP 细胞。Mujtaba 等(Dev. Biol. 214:113, 1999)报道了小鼠中的 NEP 细胞。据认为 NEP 细胞的分化会形成具有特征性表面标记的限制性祖细胞。

- 30 Mayer-ProscheI 等(Neuron 19:773, 1997)鉴定了假定的神经元限制性前体细胞(NRP)。这些细胞表达细胞表面 PS-NCAM(神经细胞粘着分子多唾液酸化的同型)。据报道它们能够产生各种类型的神经元，但不形成神经胶质细胞。

Rao 等 (Dev. Biol. 188:48, 1997) 鉴定了假定的神经胶质限制性前体细胞 (GRPs)。这些细胞显然能够形成神经胶质细胞, 但不能形成神经元。

Ling 等 (Exp. Neurol. 149:411, 1998) 从大鼠胎儿的中脑生发区域分离出了祖细胞。该细胞可生长在 EGF 中, 并可接种在涂有聚赖氨酸的平板上, 在这上面形成了
5 神经元和神经胶质细胞, 有时还会形成赖氨酸羟化酶阳性(多巴胺能)细胞, 在培养介质中加入 IL-1、IL-11、LIF 以及 GDNF 可以提高其产量。

Wagner 等 (Nature Biotechnol. 17:653, 1999) 报道了从无限增殖的多能神经干细胞系中诱导出来的有腹中脑多巴胺能表型的细胞。用 *Nurr1* 表达载体转染这种细胞, 然后和 VM 1 型星形胶质细胞一起培养。据称, 超过 80% 的所得细胞与内源多巴胺能神经元有类似的表型。
10

Mujtaba 等(见上)报道了从小鼠胚胎干(mES)细胞中分离 NRP 和 GRP。各种 NRP 具有 PS-NCAM 免疫活性, 在规定的培养基中可以自我更新, 并能分化成多种神经元表型。它们显然不能形成神经胶质细胞。各种 GRP 具有 A2B5 免疫活性, 据报道能分化成星形胶质细胞和少突胶质细胞, 但不会分化成神经元。

大量最新的发现提出, 胚胎细胞在人类治疗中可能成为有效的细胞和组织的多
15 潜能来源。多能细胞被认为能分化成身体中几乎所有类型的细胞 (R. A. Pedersen, *Scientif. Am.* 280 (4):66, 1999)。早期对胚胎干细胞的研究都是以近交小鼠品系作为模型(据 Robertson 评论, *Meth. Cell Biol.* 75:173, 1997; 以及 Pedersen, *Reprod, Fertl. Dev.* 6:543, 1994)。

20 与小鼠的 ES 细胞相比, 猴子和人类的多能细胞被证明要脆弱得多, 且不能在同样的培养条件下生长。最近才发现灵长类的胚胎细胞可进行离体培养。

Thomson 等 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995) 以恒河猴和狨猴作为模型, 第一个成功地培养了灵长类的胚胎干细胞。他们随后从人的胚泡中分离了人胚胎干(hES)细胞系 (*Science* 282:114, 1998)。Gearhart 和他的同事们从胎儿性腺组织
25 中衍生了若干人胚胎生殖(hEG)细胞系(Shamblott 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998)。hES 和 hEG 细胞都有人多能干(hPS)细胞的寻求已久的特性: 能够在体外增殖而不分化, 它们保持着正常的核型, 并能够分化产生所有成熟的细胞类型。

Reubinoff 等 (*Nature Biotechnol.* 18:399, 2000) 报道了人胚泡的体细胞分化。
30 这些细胞在培养物中可自发分化而没有统一的组织结构。培养 4-7 周后密度增高时, 可在单细胞层上形成了多细胞聚集体。培养物中不同的细胞表达各种不同的表型, 包括 β -肌动蛋白、肌间线蛋白和 NCAM。

培养物或畸胎瘤中多能干细胞的自发分化可产生表型高度异型混合的细胞群，这代表了大量不同的细胞谱系。为了治疗的目的，要求分化的细胞相对一致—不仅是它们自己的表型，而且是它们所产生后代的类型。

据此，需要有从人源的多能细胞中产生更加同型分化的细胞群的技术。

5

概述

本发明提供了一种可有效产生灵长类细胞的系统，这种细胞可从多能细胞分化成神经元细胞或神经胶质细胞谱系。对含有这类谱系前体细胞的细胞群体进行了描述，它可以为产生额外的前体细胞和中枢神经系统的成熟细胞（神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞）提供来源。本发明的某些实施方案可以产生这两种谱系的细胞。本发明的前体细胞和成熟细胞有许多重要的用途，包括药物试验以及为恢复神经系统功能而进行的治疗。

本发明的一个实施方案是，通过灵长类多能干(pPS)细胞的分化而获得的可在体外培养物中增殖的细胞群，其中，群体中至少约 30%的细胞能定向形成神经元细胞、神经胶质细胞或这两者。第二个实施方案是，含有至少约 60%神经祖细胞的可在体外培养物中增殖的细胞群，其中，至少 10%的细胞能分化成神经元细胞，至少 10%的细胞能分化成神经胶质细胞。第三个实施方案是含有至少约 60%神经祖细胞的可在体外培养物中增殖的细胞群，其中，至少有 10%的细胞表达 A2B5，至少 10%的细胞表达 NCAM。

本发明的某些细胞群是通过灵长类多能干细胞(如，人胚胎干细胞)的分化获得的。有些是通过在培养基中(含有至少两个或更多的可与生长因子受体结合的配基)由干细胞分化而获得的。有些是通过在培养基中(含有生长因子，可对表达 NCAM 或 A2B5 的分化细胞进行分选并收集已分选的细胞)使 pPS 细胞分化而获得的。有些细胞群被富集后，至少有 70%的细胞表达 NCAM 或 A2B5。

本发明另一个实施方案是含有成熟的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞或其任意组合的细胞群，这是通过使本发明的前体细胞细胞群进一步分化获得的。某些这类群体是通过在含有 cAMP 活化因子、神经营养因子或这类因子组合的培养基中培养各种神经前体细胞获得的。如下文所示，用这种方法制得的神经元能够显示出动作电位，可以显示门控钠钾通道，并且当与神经递质或其等价物一起施用时可以显示钙流。其中包括可通过(例如)酪氨酸羟化酶染色来检测含有大量多巴胺能神经元的细胞群体。

本发明的实施方案还包括，通过从一个细胞群中选出有所需表型的细胞而获得

的神经前体细胞、神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞。

从已经建立的 pPS 细胞系中分离的本发明的细胞群和分离的细胞通常与被分离的细胞系有一样的基因组。这就意味着在 pPS 细胞和神经细胞间有超过 90% 的染色体 DNA 是一样的,由此可推断出神经细胞是否是从未分化的细胞系中通过正常的有丝分裂过程获得的。用重组的方法引入转基因(如, TERT)或剔除内源性基因处理的神经细胞,仍可认为该神经细胞与被分离的细胞系有同样的核型,这是由于所有未处理的遗传要素仍然被保留下来。

本发明另一实施方案是一种筛选对神经细胞有细胞毒性或调节作用的化合物的方法,其中制备了含有这种化合物和本发明的神经细胞或细胞群的培养物,还确定了因与这种化合物接触而导致的细胞中发生的任何表型或代谢的变化。

本发明的另一个实施方案是一种获得含有核苷序列的多核苷酸的方法,据本公开进一步的描述和举例说明,此核苷序列存在于在神经祖细胞或分化细胞中有更高表达的 mRNA 中。反过来,此核苷序列又可被用来制造重组的或合成的多核苷酸、蛋白质和抗体(作为在神经细胞中被富集或抑制的基因制品)。以本发明的细胞作为免疫原或吸附剂来鉴别神经细胞中被富集或抑制的标记,这样也可以获得抗体。

本发明进一步的实施方案是一种在个体中重建或修复中枢神经系统(CNS)功能的方法,其中,对个体施用本发明的分离的细胞或细胞群。分离的细胞和细胞群可以药物制品的形式使用在临床治疗或兽医治疗中。含有本发明的细胞的药物可被加工以便用在这类治疗中。

本发明另一些实施方案是,对合适的干细胞群体采取本公开所描述的技术,以获得本发明的神经前体细胞以及完全分化的细胞的方法。其中包括,从灵长类胚胎干细胞中以 1%、3% 或 5% 的频率制造含有多巴胺能细胞的细胞群,以及能够以这一频率产生多巴胺能细胞的祖细胞群体的方法。这对于多巴胺神经元功能的丧失(这会在帕金森氏症中发生)尤其重要。本公开中所描述的组合物、方法以及技术在诊断、药物筛选以及治疗用途等方面有着相当巨大的前景。

通过以下的描述就可明白本发明的这些以及其它的实施方案。

附图

图 1 是关于分离自人胚胎干细胞的带有神经标记的细胞的生长。上图显示了细胞的生长,此细胞维持在含有 CNTF、bFGF 以及 NT3 的介质中,然后再对 NCAM 的表达进行分选。下图显示了细胞的生长,此细胞维持在含有 EGF、bFGF、PDGF 以及 IGF-1 的介质中,然后再对 A2B5 的表达进行分选。使用了四种不同的 hES 细胞系:

H1、H7、H9 和 H13。A2B5 选出的群体经 7 次传代可进一步分化成神经元细胞和神经胶质细胞。

图 2 的流程图描述了获得 A2B5 阳性细胞的示范步骤。使用了以下缩写：MEF-CM=用小鼠胚胎成纤维细胞调节培养基条件；+/-SHH=有或没有 sonic hedgehog；
5 D/F12=DMEM/F12 培养基；N2 和 B27，培养添加物(Gibco)；EPFI=分化剂 EGF、PDGF、bFGF 和 IGF-1；PLL=聚 L-赖氨酸基质；PLL/FN=聚 L-赖氨酸和纤连蛋白基质。

图 3 是新生大鼠脑组织荧光显微照片半色调的复制品，新生大鼠被施用了表达绿色荧光蛋白的细胞。左图：亲本 hES 细胞系。中图：亲本细胞系形成的胚状体细胞。右图：表达 NCAM 的分化细胞。未分化的 hES 细胞和胚状体细胞保留在用药区域
10 域内且有明显的坏死现象。相反，分化的 NCAM⁺细胞以单个细胞的形式出现，并迁移出了注射位置。

图 4 是荧光显微照片的复制品，显示了对酪氨酸羟化酶(TH)(多巴胺能细胞的标记)进行染色的细胞。将由人 ES 细胞制得的胚状体于 10 μ M 视黄酸中保留 4 天，接种在神经支持混合物中，然后传代到含有 10ng/mL NT-3 和 10ng/mL BDNF 的培养
15 基中。本发明的某些群体含有>1%的 TH 阳性的细胞。

图 5 显示了神经限制性前体对各种神经递质反应的系列图。图 A 显示了两个不同的盖玻片上单个细胞的发射数据比率。两种细胞对 GABA、高浓度的钾离子、乙酰胆碱和 ATP 都有响应。图 B 显示了所测细胞响应特定神经递质的频率。图 C 显示了所观察到的对神经递质组合物的响应。

图 6 显示了神经限制性前体的电生理学特性的系列图。图 A 显示了在两个细胞(去极化以从-100mV 的支持电势开始检测-80 至 80mV 之间的电势)中观察到的钠电流和钾电流。图 B 显示了所观察到的电流-电压关系的输入(Na⁺)和输出(K⁺)的峰。图 C 显示了同一细胞对去极化刺激 n 次响应之后产生的动作电位。这些测量显示，分离自人 ES 细胞的神经前体细胞能够产生作为神经传递特征的动作电位。
20

25

发明详述

本发明提供了一种制备并定性神经祖细胞的系统，它适用于治疗用药和药物筛选。

已知在选定的分化剂存在的条件下培养多能干细胞时，新产生的细胞群体有显著高比例的细胞带有神经细胞的表型特征。或者，根据细胞表面标记对分化的细胞
30 进行分选可以提高神经细胞的比例。由于特定类型的多能干细胞(如胚胎干细胞)在培养物中可以增殖一年或更长的时间，此公开中所描述的发明提供了几乎无限的

神经前体细胞的补给。本发明的某些细胞群能够产生神经元细胞或神经胶质细胞，通过在培养物中大量传代它们可被复制。

图 1 显示了细胞的生长曲线，其中的细胞和不同的分化剂一起培养，然后再根据它们是否带有聚唾液酸化的 NCAM 或 A2B5 抗原决定簇进行挑选。这些细胞群都可以
5 可以通过细胞大量倍增来增殖。

对 A2B5 表达呈阳性选出的分化细胞中含有明显表达 A2B5 而不表达 NCAM 的细胞，以及同时表达 A2B5 和 NCSM 的细胞。在下面描述的各项试验之一中，这些细胞成熟后可产生 13% 的少突胶质细胞以及 38% 的神经元。由于这些细胞在长期培养增殖后没有丧失它们的表型，故这一群体可为多能细胞提供储备。在向 CNS 功能障碍的个体施用
10 时，按照需要，该群体包括可同时恢复神经元细胞谱系和神经胶质细胞谱系的细胞。

如果需要的话，神经前体细胞可在体外进一步分化，或者通过和成熟因子(如神经营养因子)一起培养，或者通过除去一种或多种维持祖细胞更新的因子。神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞是神经谱系的成熟的分化细胞，它们可以照这样
15 培养前体细胞而获得。用这些方法获得的神经元这种细胞类型的特征被放大，即可被神经丝和 MAP-2 等神经特异性标记染色，以及有明显的突触形成(通过对突触泡蛋白进行染色以鉴定)。图 5 显示，这些细胞对许多神经递质物质都有反应。图 6 显示，在标准膜片夹系统中测量时，这些细胞能够显示出动作电位。所有这些方面表明，这些细胞明显具备完善的神经功能。

20 人们特别感关注的是这一系统产生多巴胺能神经元的能力(图 4)。为治疗帕金森氏症特别需要这种类型的细胞，对这种疾病目前最好的治疗方法就是同种异体移植胎儿脑组织。在临床治疗中使用胎儿组织有很多有关供应和程序上的问题，但以前所说的来源没有一种可以提供充足的正确类型的细胞。本发明的神经前体细胞能够产生分化的细胞，这些细胞中有一定比例的神经元具有多巴胺能的表型。可以认为，这一比例在帕金森氏症的细胞置换治疗中已经足够了，并且也证明本发明的祖
25 细胞群体有治疗方面的用途。

由于本发明的多能干细胞以及一些谱系限制性的前体细胞可在培养物中大量增殖，本公开中所描述的系统为研究、药物开发和 CNS 功能障碍的治疗提供了神经元细胞以及神经胶质细胞的无限供给。以下的描述进一步阐述了本发明的细胞的制
30 备和应用。

定义

为了公开的目的，术语“神经祖细胞”或“神经前体细胞”是指一种细胞，它所产生的后代或者是神经元细胞(如，神经元前体或成熟的神经元)或者是神经胶质细胞(如，神经胶质细胞前体、成熟的星形胶质细胞或成熟的少突胶质细胞)。一般地，这些细胞表达某些有神经谱系特征的表型标记。通常，当体外培养时它们不会产生其它胚胎生发层的后代，除非以某些方式消除分化或重新编程。

“神经元祖细胞”或“神经元前体细胞”是指能够产生成熟的神经元后代的细胞。这些细胞能够或不能够产生神经胶质细胞。

“神经胶质祖细胞”或“神经胶质前体细胞”是指能够产生成熟的星形胶质细胞或成熟的少突胶质细胞的细胞。这些细胞能够或不能够产生神经元细胞。

“多能神经祖细胞群体”是指能够同时产生神经元细胞的后代(如，神经元前体或成熟的神经元)和神经胶质细胞的后代(如，神经胶质前体、成熟的星形胶质细胞或成熟的少突胶质细胞)，且有时会产生其它类型细胞的细胞群体。这一术语并不要求群体中的各个细胞都能够形成两种类型的后代，尽管有个别细胞可能是多能的神经祖细胞。

在细胞个体发生中，“分化的”是一个对术语。“分化的细胞”是指与对照细胞相比沿着发育途径可进一步发展的细胞。因此，多能胚胎干细胞可以分化成谱系限制的前体细胞，如造血细胞，它对于各类血细胞是多能的；肝细胞前体，它对于肝细胞是多能的；以及上面提到的各种类型的神经祖细胞。它们可沿着发育途径进一步依次分化成其它类型的前体细胞，或分化成终末分化细胞，终末分化细胞在某一组织类型中起着特定的作用，它们能够或不能够进一步增殖。神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞都是终末分化细胞的例子。

本公开中所使用的“分化剂”是指可用在本发明的培养系统中以产生神经谱系的分化的细胞(包括前体细胞和终末分化的细胞)的一大类化合物中的一种。对于这些化合物作用的模式没有加以限制。例如，这种试剂可通过诱导或参与表型的变化、促进有特殊表型的细胞的生长或减缓其它细胞的生长、或通过某些未知的机制与其它试剂联合作用来帮助分化过程。

除非另有明确的说明，本发明的技术可不受限制地使各种类型的祖细胞分化成神经元细胞或神经胶质细胞。

原型“灵长类多能干细胞”(pPS 细胞)是从受精后任何时候的胚胎前期组织、胚胎组织或胎儿组织中分离的多能细胞，根据可接受的标准试验，在合适的条件下它们能够产生内、中、外三个胚层中各种不同细胞类型的后代，比如能够在 8-12 周的 SCID 小鼠中形成畸胎瘤。

pPS 细胞的定义中包括各种类型的胚胎细胞, 如, Thomson 等描述的 (Science 282:1145, 1998) 人胚胎干 (hES) 细胞; 其它灵长类的胚胎干细胞, 如猕猴干细胞 (Thomson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995)、狨猴干细胞 (Thomson 等, Biol. Reprod. 55:254, 1996) 以及人胚胎生殖 (hEG) 细胞 (Shamblott 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998), 这一术语中还包括其它类型的多能细胞。任何可产生由三个胚层衍生的后代的源自灵长类的细胞都包括在内, 不论它们是否来自于胚胎组织、胎儿组织或其它的来源。pPS 细胞并非分离自恶性来源。细胞最好具有正常的核型 (但并不总是如此)。

当群体中大量的干细胞和它们的衍生物有不分化细胞的形态学特征时, pPS 细胞的培养物就被称为是“未分化的”, 这可清楚地将它们与胚胎或成人来源的分化的细胞区分开来。熟练掌握这一技术的技术人员可以容易地识别出未分化的 pPS 细胞, 在显微镜视野的二维平面中, 它们通常出现在核/胞质比较高且有显著细胞核的细胞集落中。人们认为, 群体中未分化细胞的集落通常会被邻近已分化的细胞包围。

“饲养细胞”或“饲养者”这两个术语通常是指和另一种细胞共培养的一种细胞, 它们为第二种细胞提供了可生长的环境。例如, 某一类型的 pPS 细胞可被小鼠原代胚胎成纤维细胞、无限增殖的小鼠胚胎成纤维细胞、或是由 hES 细胞分化的人成纤维样细胞支持。如果在 pPS 分裂后不再加入新鲜的饲养细胞以支持其生长而已经长过至少一轮, 该 pPS 细胞群体就可认为“基本上不需要”饲养细胞了。

“胚状体”与“集合体”是同义词。它们是指分化的和未分化的细胞的集合, 当 pPS 细胞在单层培养物中过度生长, 或被维持在悬浮培养物中时就会出现这种集合。胚状体是不同细胞类型的混合物, 通常来自于几个胚层, 可通过形态学判定标准以及用免疫化学的方法可检测的细胞标记将其辨别。

“生长环境”是指相关细胞可在体外增殖、分化或成熟的环境。环境的特征包括培养细胞的培养基、各种生长因子或可能存在的各种分化诱导因子、以及 (如果存在的话) 支持结构 (如, 固体表面的基质)。

当通过任何合适的人工处理的手段将多核苷酸转移到细胞中, 或者细胞是原先被改变的细胞的后代并继承了这一多核苷酸时, 这种细胞就被称作是“遗传转变的”、“转染的”或是“遗传转化的”。多核苷酸中通常含有编码相关蛋白质的可转移的序列, 它使细胞能以高水平表达这种蛋白质。如果被改变的细胞的后代保持有同样的变化, 这种遗传改变就称为“可遗传的”。

本公开中使用的“抗体”一词是指多克隆和单克隆抗体。这一术语的范围不仅

包括完整的免疫球蛋白分子, 还包括免疫球蛋白分子的片段以及衍生物(如, 单链 Fv 结构、二体、以及融合结构), 它们可以用这一领域中已知的技术来制备, 并保持了所需的抗体结合特异性。

5 常规技术

为进一步详细描述在本发明的实践中所使用的常规技术, 实践者可参看有关细胞生物学、组织结构学以及胚胎学的标准的教科书及评论。包括 *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E. J. Robertson 编, IRL 出版有限公司, 1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman 等编, 学术出版社, 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P. D. Rathjen 等, Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998)。

为进一步详细描述神经细胞异常以及各种类型的神经细胞、标记和相关溶解因子的特征, 读者可以参阅 *CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances*, M. H. Tuszynski 和 J. H. Kordower 编, 学术出版社, 1999。

分子遗传学和基因工程中的各种方法的描述可参见: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版 (Sambrook 等, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Galt 编, 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney 编, 1987); *Methods in Enzymology* 丛书 (学术出版社); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 和 M. P. Calos 编, 1987); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 第三版 (F. M. Ausubel 等编, 1987 和 1995); 以及 *Recombinant DNA Methodology II* (R. Wu 编, 学术出版社, 1995)。本公开中提到的试剂、克隆载体以及遗传学操作试剂盒可以商业供货者中获得, 如 BioRad、Stratagene、Invitrogen 以及 ClonTech。

在抗体培养、提纯和修饰中使用的常规技术, 以及包括免疫组织化学在内的免疫测定的设计和实施, 读者可以参考 *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等编, 1991); 以及 R. Masseyeff, W. H. Albert 和 N. A. Staines 编, *Methods of Immunological Analysis* (Weinheim: VCH Verlags GmbH, 1993)

干细胞的来源

本发明可用各种类型的干细胞进行操作, 其中包括以下非限制性的实施例。

美国专利 5, 851, 832 号中报道了从脑组织中获得的多能神经干细胞。美国专利 5, 766, 948 号中报道了从新生儿大脑半球制造成神经细胞。美国专利 5, 654, 183 和 5, 849, 553 号报道了哺乳类神经嵴干细胞的应用。美国专利 6, 040, 180 5 号报道了从哺乳类多能 CNS 干细胞培养物中体外产生分化的神经元。WO 98/50526 和 WO 99/01159 报道了神经上皮干细胞、少突胶质细胞-星形胶质细胞前体以及谱系限制的神经元前体的产生和分离。美国专利 5, 968, 829 号报道了从胚胎前脑获得的神经干细胞, 并用含有葡萄糖、运铁蛋白、胰岛素、硒、黄体酮和其它生长因子的培养基进行培养。

10 除非另有说明, 本发明可用任何脊椎动物的干细胞进行操作。包括人类的干细胞, 以及非人灵长类、家养动物、家畜和其它非人的哺乳动物。

适宜用在本发明中的干细胞包括灵长类多能干(pPS)细胞, 这是从怀孕后形成的组织中分离的, 例如胚泡或取自怀孕过程中任一时刻的胎儿或胚胎组织。非限制性的例子是胚胎干细胞或胚胎生殖细胞的原代培养物或建立的细胞系。

15

胚胎干细胞

胚胎干细胞可以从灵长类动物的胚泡中获得(Thomson 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844, 1995)。采用 Thomson 等所描述的技术(美国专利 5, 843, 780 号, Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 以后, 1998) 20 或 Reubinoff 等描述的技术(Nature Biotech. 18:399, 2000), 可从人胚泡细胞中制备人胚胎干(hES)细胞。

简单地说, 人胚泡是从人体内植入前的胚胎中获得的。或者, 也可以使用体外受精(IVF)的胚胎, 或者单细胞人类胚胎也可扩大到胚泡期(Bongso 等, Hum Reprod 4:706, 1989)。在 G1.2 和 G2.2 培养基中将胚胎培养到胚泡期(Gardner 等, 25 Fertil. Steril, 69:84, 1998)。通过用链霉菌蛋白酶(Sigma)短时处理从发育的胚泡中除去透明带。用免疫外科的方法分离内细胞团, 其中, 将胚泡在稀释 50 倍的兔抗人脾细胞的抗血清中暴露 30 分钟, 然后在 DMEM 中洗涤 5 分钟, 共洗涤三次, 再在稀释 5 倍的豚鼠补体(Gibco)中暴露 3 分钟(Soiter 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72:6099, 1975)。再在 DMEM 中洗涤两次, 缓慢吸液, 从完整的内细胞团(ICM)中用 30 吸管轻轻吸去溶解的滋养外胚层细胞, 将 ICM 接种在 mEF 饲养细胞层上。

9-15 天后, 将内细胞团向外生长的附生物分离成团块, 将团块或者暴露在没有钙和镁的含有 1mM EDTA 的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 或者暴露在分散酶或胰蛋白酶中,

或是用微量移液管机械分离；然后重新接种在新鲜培养基中的 mEF 上。用微量移液管逐一分离出有未分化形态的生长集落，机械地将其分离成团块并重新接种。可以确定 ES 样的形态，即有明显高核/胞质比和显著细胞核的致密集落。通过胰蛋白酶短时作用、暴露于 Dulbecco' sPBS (含有 2mM EDTA) 培养基、暴露于 IV 型胶原酶 (约 5 200U/ml; Gibco) 或是用微量移液管挑选各个集落，将所得 ES 细胞每 1-2 周例行分裂一次。团块的大小约 50-100 个细胞之间最为理想。

胚胎生殖细胞

人胚胎生殖 (hEG) 细胞可由原始的生殖细胞 (存在于最后一次经期后约 8-11 周的胎儿材料中) 中制得。合适的制备方法描述在 Shanblott 等, Prco.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726, 1998 以及美国专利 6, 090, 622 号中。

简单地说，生殖嵴可用等渗缓冲液冲洗，然后将其放进 0.1 毫升 0.05% 的胰蛋白酶/0.53mM EDTA 钠盐的溶液 (BRL) 并切成小于 1mm³ 的块。然后用移液管通过 100 μ L 的液滴吸取该组织块，使细胞进一步解聚。将其在 37°C 温育约 5 分钟，再加入约 3.5mLEG 生长培养基。EG 生长培养基是 DMEM、4500mg/L D-葡萄糖、2200mg/L 15 mM NaHCO₃；含 15% ES 的合格胎牛血清 (BRL)；2mM 谷氨酰胺 (BRL)；1mM 丙酮酸钠 (BRL)；1000-2000U/ml 人重组白血病抑制因子 (LIF, Genzyme)；1-2ng/ml 人重组 bFGF (Genzyme)；以及 10 μ M 毛猴素 (溶于 10% DMSO)。或者，可用透明质酸酶/胶原酶/DNA 酶分离 EG 细胞。从胎儿材料上分离带有肠系膜的生殖腺原基或生殖嵴，20 用 PBS 冲洗生殖嵴，然后将其置于 0.1ml HCD 消化液中 (0.01% V 型透明质酸酶、0.002% I 型 DNA 酶、0.1% IV 型胶原酶，所有这些均来自于 Sigma 公司，用 EG 生长培养基制备)。将组织搅碎，于 37°C 温育 1 小时或过夜，然后重新悬浮在 1-3mLEG 生长培养基中，并接种在饲养层上。

准备含有饲养细胞 (如，STO 细胞，ATCC 第 CRL 1503 号) 分会合层的 96 孔组织 25 培养平板，将其在不含 LIF、bFGF 或毛猴素的改良 EG 生长培养基中温育 3 天，用 5000 拉德的 γ 射线灭活，向每个孔中加入约 0.2mL 原代生殖细胞 (PGC) 悬浮液。约 7-10 天后在 EG 生长培养基上进行第一次传代，将每个孔中的物质转移到预先准备的含有灭活 STO 小鼠成纤维细胞的 24 孔培养皿的一个孔中。在每天更换培养基的情况下培养细胞，直至细胞形态与 EG 细胞一致，这通常要 7-30 天或 1-4 次传代。

30

不分化状态下 pPS 细胞的繁殖

在促进繁殖但不促进分化的培养条件下 pPS 细胞可以连续繁殖。作为范例的含

血清的 ES 培养基是用 80% 的 DMEM (如 Gibco 公司的剔除 DMEM)、20% 规定的胎牛血清 (FBS, Hyclone) 或血清代用品 (WO 98/30679)、1% 的非必需氨基酸、1mM L-谷氨酰胺和 0.1mM β -巯基乙醇制备的。使用前, 加入人 bFGF 至 4ng/mL (WO 99/20741, Geron 公司)。

- 5 习惯上在饲养细胞层上培养 ES 细胞, 通常已从胚胎或胎儿组织上分离去成纤维细胞。从怀孕 13 天的 CF1 小鼠中收获胚胎, 将其转移到 2mL 胰蛋白酶/EDTA 中, 搅碎, 并在 37°C 下温育 5 分钟。加入 10% PBS 使残渣沉淀, 将细胞放在 90% DMEM、10% FBS 和 2mM 谷氨酰胺中繁殖。为制备饲养细胞层, 将细胞辐照处理以抑制增殖, 但允许合成支持 ES 细胞的因子 (约 4000 拉德的 γ 射线)。用 0.5% 的明胶覆盖培养
- 10 平板过夜, 每个孔中接种 375, 000 辐照过的 mEF, 放置 5 小时至 4 天。将此培养基换成新鲜的 hES 培养基并即时接种 pPS 细胞。

- Geron 的科学家发现 pPS 细胞即便在没有饲养细胞的情况下也可以保持不分化的状态。没有饲养者的培养基环境包括合适的培养基质, 特别是像 Matrigel® 或层粘连蛋白之类的胞外基质。以大于每平方厘米 15, 000 个细胞的密度接种细胞 (较
- 15 为理想的是每平方厘米 90, 000-170, 000 个)。通常在细胞完全分散之前停止用酶消化 (例如, 用胶原酶 IV 时约为 5 分钟)。然后将约 10-2000 个细胞的团块直接接种在基质上而不用进一步分散处理。

- 通常通过培养辐照处理过的原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化的小鼠成纤维细胞或从 pPS 细胞中分离的成纤维样细胞来调节营养培养基条件, 以支持无饲养者的
- 20 培养物。也可以每平方厘米约 $5-6 \times 10^4$ 个细胞的密度将饲养者接种在像 KO DMEM (替换其中的 20% 血清并加入 4ng/mL bFGF) 之类的无血清的培养基上, 以调节培养基。在调节培养基 1-2 天后进一步补充 bFGF 以支持 pPS 细胞生长 1-2 天。

- 显微镜下, ES 细胞有高度核/胞质比、显著的细胞核、以及细胞连接较难辨认的紧密的集落结构。灵长类 ES 细胞表达阶段特异的胚胎抗原 (SSEA) 3 和 4, 并表达
- 25 可用抗体标明的 Tra-1-60 和 Tra-1-81 检测的标记 (Thomson 等, Science 282:1145, 1998)。小鼠 ES 细胞可作为 SSEA-1 的阳性对照, 并可作为 SSEA-4、Tra-1-60 和 Tra-1-81 的阴性对照。SSEA-4 始终出现在人胚胎癌 (hEC) 细胞上。pPS 细胞在体外的分化导致 SSEA-4、Tra-1-60 和 Tra-1-81 表达的丧失, 并会增加 SSEA-1 的表达。在 hEG 细胞上也发现了 SSEA-1。

30

制备神经前体和终末分化细胞的材料和过程

本发明的某些神经前体细胞是在可富集有所需表型的细胞 (或者使所需细胞生

长, 或者抑制或杀死其它的细胞类型)的特殊生长环境下培养、分化或重新编程干细胞而获得的。这些方法可用于多种干细胞, 包括在前面描述过的灵长类多能干(pPS)细胞。

通常, 分化过程是在含有合适基质和添加了分化剂的营养培养基中发生的。合适的基质包括带有正电荷(如碱性氨基酸, 例如, 聚-L-赖氨酸和聚鸟氨酸)的固体表面。该基质可被胞外基质组分(如纤连蛋白)覆盖。另一种胞外基质包括 Matrigel®(来自于 Engelbreth-Holm-Swarm 肿瘤细胞的胞外基质)和层粘连蛋白。各种组合的基质也适用, 像结合有纤连蛋白的聚-L-赖氨酸、层粘连蛋白或是以上两者同用。

合适的分化剂包括各种类型的生长因子, 如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α), 以及各种类型的成纤维细胞生长因子(例如, FGF-4、FGF-8 以及碱性成纤维细胞生长因子=bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF-1 及其它)、高浓度胰岛素、sonic hedgehog、神经营养蛋白家族的成员(如神经生长因子=NGF、神经营养蛋白 3=NT-3、脑衍生神经营养因子=BDNF)、骨形态发生蛋白(特别是 BMP-2 和 BMP-4)、视黄酸(RA)和与 gp130 复合的受体的各种配体(如, LIF、CNTF 和 IL-6)。可结合到上述因子各自的细胞表面受体上的各种可选择的配体或抗体也同样合适。通常, 使用了多种分化剂, 包括上面所列举的或以下实施例中的试剂中的 2、3、4 或更多种。例如, 含有 EGF、bFGF、PDGF 和 IGF-1 的混合物(实施例 1 和 2)。

这类因子被提供给营养培养基中的细胞, 营养培养基可以是任何支持所需细胞类型增殖或存活的培养基。通常最好是以提供游离氨基酸而不是血清作为营养成分的确定成分培养基。向培养基中加入添加剂以维持神经细胞培养物也是有益的。例如 N2 和 B27 添加剂(可从 Gibco 公司购得)。

当干细胞是 pPS 细胞时, 在合适的分化剂的混合物中培养这些细胞(可从饲养细胞或无饲养者的培养物中获得)也可使其分化。

在激发分化的一种方法中, pPS 细胞被直接接种在合适的基质上, 如粘附玻璃或塑料表面, 比如用聚胺涂层。然后在合适的营养培养基(可促使细胞分化成所需细胞系)中培养细胞。这就被称为“直接分化”法。

另一种方法中, 首先使 pPS 细胞分化成异质细胞群体。在一个变化实例中, 将 pPS 细胞在悬浮液中培养可使其形成胚状体。或者, 可以在培养基中加入一种或多种上述分化剂(如视黄酸)以在胚状体内促进分化作用。胚状体达到足够的尺寸后(通常要 3-4 天), 将它们接种在分化培养物的基质上。胚状体可直接接种在基质上

而不用使细胞分散开来。这可使神经细胞前体迁移出胚状体并进入胞外基质。随后将这些培养物在合适的培养基上传代以帮助选择出神经祖细胞。

根据这一步骤制备的细胞被发现能够进一步增殖(实施例 1)。多达 30%、50%、75%或更多的细胞表达聚唾液酸化的 NCAM 或 A2B5 抗原决定簇,或是这两者一起表达。通常,至少约 10%、20%、30%或 50%的细胞表达 NCAM,至少约 10%、20%、30%或 50%的细胞表达 A2B5—这说明它们能够分别形成神经元谱系和神经胶质谱系的细胞。

或者,分化的细胞可根据表型特征进行分选以富集某一群体。通常,这包括将各个细胞与神经细胞特有的标记的抗体或配体相结合,然后将特异识别的细胞与群体中其它的细胞分离。一种方法是免疫淘选,其中使特异性抗体结合到固体表面,再将细胞与表面相接触,不表达标记的细胞被冲掉。然后用更强的洗脱液回收结合的细胞。这是一种亲和层析和抗体介导的磁细胞分选法的复法。在典型的分选过程中,细胞和特定的一级抗体结合,然后用结合在磁珠上的二级抗免疫球蛋白试剂捕获。再在磁场中收集磁珠以回收吸附的细胞。

另一种方法是荧光-活化细胞分选法,其中表达标记的细胞被特定的抗体所标记,这通常通过荧光标记的二级抗免疫球蛋白。然后根据结合标记的量用合适的分选装置将细胞各个分离。这些方法中任何一个都可以回收带有相关标记的阳性选定的细胞群体,以及有足够密度或容易变成阳性选定的不带标记的阴性选择的细胞群体。将细胞与特定的抗体以及可溶解细胞的补体制剂(其上结合有抗体)依次温育,也可以有效的进行阴性选择。分化的细胞的分选可在任何时候进行,但通常发现在分化过程开始以后不久进行分选其效果最好。

据发现对聚唾液酸化的 NCAM 阳性选择的细胞可以提供有 60%、70%、80%甚至 90%NCAM 阳性的群体(实施例 1)。这说明它们能够形成某些类型的神经细胞,包括神经元。

发现对 A2B5 阳性选择的细胞可提供有 60%、70%、80%甚至 90%A2B5 阳性的群体(实施例 2)。这说明它们能够形成某些类型的神经细胞,可能同时包括神经元和神经胶质细胞。A2B5 阳性细胞被进一步分成两个独立的群体:一种是 A2B5 阳性而 NCAM 阴性,一种是 A2B5 阳性且 NCAM 阳性。

根据这一步骤制备的分化或分离的细胞可以在任何合适的培养基中维持或进一步增殖。通常,培养基含有最初用来使细胞分化的大部分成分。

如果需要的话,根据这些步骤制备的神经前体细胞可进一步分化成成熟的神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞。将细胞培养在成熟因子(如,毛猴素)或可提高

胞内 cAMP 水平的其它化合物(如, 霍乱毒素、异丁基甲基黄嘌呤、二丁基腺苷环化单磷酸)、或其它因子(如, c-kit 配体、视黄酸或神经营养蛋白)中是有效的。特别有效的是神经营养蛋白-3(NT-3)和脑衍生神经营养因子(BDNF)。其它候补的物质有 GDNF、BMP-2 和 BMP-4。或者还有, 除去部分或所有这些可促进神经前体增殖的因子(如, EGF 或 FGF)也可以提高成熟过程。

为了用于治疗或其它用途, 往往需要前体细胞或成熟的神经细胞群体基本上没有未分化的 pPS 细胞。一种从群体中除去未分化的干细胞的方法是, 用载体转移这些细胞, 载体中的效应基因在启动子控制下, 可在未分化的细胞中优先表达。合适的启动子包括 TERT 启动子和 OCT-4 启动子。效应基因可以直接溶解细胞(例如, 编码毒素或凋亡介体)。或者, 效应基因可使细胞对外部试剂(如, 抗体或前药)的毒性作用易感。例如, 单纯疱疹胸苷激酶(*tk*)基因, 它可以导致表达这一基因的细胞对鸟嘌呤易感。合适的 pTERT-*tk* 结构提供在国际专利公布第 WO 98/14593 号(Morin 等)中。

15 神经前体和终末分化细胞的特征

根据一些表型判定标准可以将细胞定性。这些标准包括(但不限于)显微镜观察的形态学特征、对表达的细胞标记进行定性或定量、酶活性、或是神经递质及其受体、以及电生理学功能。

本发明中包括的某些细胞具有神经元细胞或神经胶质细胞所特有的形态学特征。这些特征可以很容易地被那些精通于评价此类细胞存在情况的技术人员识别。例如, 神经元的特征是细胞体小, 有多种形式的轴突和树突。本发明的各种细胞也可以根据它们是否表达各种类型神经细胞特有的表型标记而加以定性。

相关的一些标记包括(但不限于)神经元特有的 β -微管蛋白 III、微管相关蛋白 2(MAP-2)或是神经丝; 存在于星形胶质细胞中的胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP); 少突胶质细胞特有的半乳糖脑苷脂(GalC)或鞘磷脂碱性蛋白(MBP); 未分化的 hES 细胞特有的 Oct-4; 神经前体和其它细胞特有的 Nestin; 以及已描述过的 A2B5 和聚唾液酸化的 NCAM。当研究神经谱系的细胞时, 由于 A2B5 和 NCAM 是有用的标记, 值得注意的是这些标记有时也会在其它的细胞类型(如, 肝细胞或肌肉细胞)上出现。以前认为 β -微管蛋白 III 是神经细胞特异的, 但现在发现 hES 细胞的一些亚群也呈 β -微管蛋白 III 阳性。MAP-2 对各种类型的完全分化的神经元是比较严格的标记。

本公开中提到的且在本技术领域已知的各种组织特异性标记都可用合适的

免疫学技术加以检测—例如,对细胞表面标记采用流式免疫细胞化学方法;对胞内或细胞表面标记采用免疫组织化学方法(例如,固定的细胞或组织碎片);对细胞提取物采用 Western 印迹分析法;以及对细胞提取物或分泌在培养基中的产物采用酶联免疫分析法。在标准的免疫细胞化学法或流式细胞分析法中,如果有明显可测量的抗体与抗原相结合,细胞对该抗原的表达则被称为是“抗体可检测的”,这可在细胞固定后进行,或者可以使用标记过的二级抗体或其它共轭对(如生物素-抗生物素蛋白共轭对)以放大标记。

也可以在 mRNA 水平上检测组织特异性基因表达的产物,方法有 Northern 印迹分析法、斑点印迹杂交分析法、或是在标准扩增方法中使用序列特异性引物的逆转录酶启动的-聚合酶链式反应(RT-PCR)。参见美国专利 5,843,780 号可进一步了解细节。本公开中所列举的特定标记的序列数据可从 GenBank(URL www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez)之类的共享的数据库获得。如果根据标准步骤在一个典型的受控试验中对细胞样品进行分析,可观察到可辨别的杂交或扩增产物,则如本公开所述的一种分析法在 mRNA 水平上的表达被称为是“可检测的”。

在蛋白质或 mRNA 水平上检测的组织特异性标记的表达被认为是阳性的,如果这一水平至少超过对照细胞(如,未分化的 pPS 细胞、成纤维细胞或其它不相关的细胞类型)2 倍,较好的是超过 10 倍或 50 倍的话。

同样作为神经细胞,尤其是终末分化细胞,特征的是受体和生物合成、释放和神经递质再摄取中包含的酶类,以及与突触传递相关的去极化和再极化过程中所包含的离子通道。对突触小泡蛋白进行染色可以获得突触形成的证据。对 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸盐、多巴胺、3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)、去甲肾上腺素、乙酰胆碱和五羟色胺的受体进行检测,可以获得对这些神经递质的吸收性的证据。

本发明的特定神经前体细胞群体的分化(例如,使用 NT-3 和 BDNF)可以产生至少有 20%、30%或 40% MAP-2 阳性的细胞群体。基本上,有 5%、10%、25%或更多 NCAM 或 MAP-2 阳性的细胞能够合成神经递质,如乙酰胆碱、甘氨酸、谷氨酸盐、去甲肾上腺素、五羟色胺或 GABA。

通过免疫细胞化学或 mRNA 表达检测可知,本发明的某些群体有 0.1%含有 NCAM 或 MAP-2 阳性的细胞,可能有 1%、3%或 5%或更多(在细胞计数的基础上)为酪氨酸羟化酶(TH)阳性。在本技术领域,这通常被认为是多巴胺合成细胞的标记。

为进一步说明在分化的群体中存在着成熟的神经元,可根据功能标准来检测该细胞。例如,在对神经递质或已知可在体内影响神经元的其它的环境条件的反应中,可用任何标准的技术来测量钙流。首先,通过形态学标准或通过 NCAM 之类的标记

确定群体中的神经元样细胞。然后对细胞施加神经递质或条件并监测反应情况(实施例 6)。也可对细胞使用标准膜片箝术,以确定是否有动作电位的证据,以及
在所加电位和反应之间的滞后时间如何。本发明的神经前体群体的分化可以产生某些
具有神经元形态学特征的亚群的培养物,这种培养物对 NCAM 或 MAP-2 呈阳性,并
5 且以以下频率作出反应:至少有约 40%、60%或 80%的细胞对 GABA、乙酰胆碱、
ATP 和高浓度钠作出反应;至少有约 5%、10%或 20%的细胞对谷氨酸盐、甘氨酸、
抗坏血酸、多巴胺或去甲肾上腺素作出反应。膜片箝术系统中,有较大比例 NCAM
或 MAP-2 阳性的细胞(至少约 25%、50%或 75%)可显示出动作电位。

根据本发明所述的确定细胞群体品质的一些标准方法,以及细胞增殖和分化的
10 最优化条件,还可以显示与功能性神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞以及它们的
前体相一致的其它理想特征。

神经前体的端粒化

在某些药物的筛选和治疗中,需要神经前体有复制能力,并且需要为产生分化
15 的神经元细胞和神经胶质细胞的产生提供容器。在发展成限制性发育谱系的细胞或
终末分化细胞之前或之后,本发明的细胞可以被端粒化以提高它们的复制潜能。端
粒化的 pPS 细胞可以沿前述分化途径分化,或者分化的细胞也可以直接被端粒化。

通过遗传转化,用合适的载体进行转染或转导、同源重组、或其它合适的技术,
可以使细胞端粒化,这样它们就会表达端粒酶催化组分(TERT),通常,除了内源启
20 动子的作用以外,在外源启动子作用下也可提高端粒酶的表达。特别合适的是国际
专利申请 WO 98/14592 中提供的人端粒酶的催化组分(hTERT)。对于某些用途,也
可以使用像小鼠 TERT(WO 99/27113)之类的物种同系物。Bodnar 等, Science
279:349, 1998 和 Jiang 等, Nat. Genet. 21:111, 1999 中描述了人类细胞中端粒酶的
转染和表达。在另一个例子中, hTERT 的克隆(WO 98/14592)被用作 hTERT 编码序
25 列的来源,并在 MPSV 启动子控制下被剪接进 PBBS212 载体的 EcoRI 位点,或在 LTR
启动子控制下接入 pBABE 逆转录病毒载体(可从市场上获得)的 EcoRI 位点。

用含有上清液的载体使分化或未分化的 pPS 细胞遗传转化超过 8-16 小时,然
后换成生长培养基培养 1-2 天。用 0.5-2.5 μ g/mL 的嘌呤霉素选取遗传转化的细胞,
并重新培养。再通过 RT-PCR、端粒酶活性(TRAP 分析)、hTERT 的免疫细胞化学染
30 色或复制能力来评价 hTERT 的表达。以下用于研究目的的分析试剂盒可从市场上获
得: TRAPeze®XL 端粒酶检测试剂盒(目录 s7707; Intergen 公司, 购于纽约); 以
及端粒 TAGGG 端粒酶 PCR ELISA plus(目录 2, 013, 89; Roche

5 Diagnostics, Indianapolis 印第安纳州)。也可通过 RT-PCR 在 mRNA 水平上评价 TERT 的表达。市场上可获得用于研究目的的 LightCycler 端粒 TAGGG hTERT 量化试剂盒(目录 3, 012, 344; Roche Diagnostics)。连续复制的克隆可在支持增殖的条件下进一步培养以富集, 具有所需表型的细胞也可随意地通过有限稀释来克隆。

- 在本发明的某些实施方案中, pPS 细胞可分化成各种多能或定型的神前体, 然后经遗传转化以表达 TERT。在本发明的另一些实施方案中, pPS 细胞经遗传转化以表达 TERT, 然后再分化成各种神经前体或终末分化细胞。提高 TERT 表达的改进措施成功与否可通过 TRAP 分析, 或以细胞的复制能力是否改善来确定。
- 10 预期还有其它一些使细胞无限增殖的方法, 例如转化带有编码 myc、SV40 大型 T 抗原或 MOT-2 的 DNA 的细胞(美国专利 5, 869, 243 号, 国际专利申请 WO 97/32972 和 WO 01/23555)。当细胞被用作治疗目的时, 用癌基因或肿瘤病毒的产物进行转染就不是很合适了。在本发明的应用中端粒化的细胞倍受瞩目, 其优点在于它使细胞能够增殖并保持其核型—例如, 在药物筛选和治疗方案中, 可对个体施用分化的
- 15 细胞以增强其 CNS 的功能。

神经前体和终末分化细胞的应用

- 本发明提供了大量产生神经前体细胞和成熟的神经元细胞和神经胶质细胞的方法。这些细胞群体可用在许多重要的研究、开发中以及用于商业目的。
- 20 本发明的细胞可被用来制备 cDNA 文库, 相对而言, 这种文库没有被其它谱系的细胞中优先表达的 cDNA 污染。例如, 以 1000rpm 离心 5 分钟以收集多能神经祖细胞, 然后用标准技术从共沉淀物中提取 mRNA (Sambrook 等, 同上)。将其逆转录成 cDNA 后, 这种制剂可从任何或所有下述细胞类型中除去 cDNA: 定向为神经元细胞或神经胶质细胞谱系的细胞、成熟的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞或
- 25 其它非所需特异性的细胞。这就制成了选择性 cDNA 文库, 它反映了较之终末分化细胞可优先在神经元前体中表达的转录物。用类似的方法, 也可以制成可优先在神经元前体或神经胶质前体, 或成熟的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞中表达的转录物。

- 本发明分化的细胞也可以用来制备对多能神经前体, 定向为神经元细胞或神经
- 30 胶质细胞谱系的细胞, 成熟的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的标记具有特异的抗体。本发明提供了提高此类抗体产量的改进的方法, 因为与 pPS 细胞培养物以及直接从 CNS 组织提取的神经元细胞和神经胶质细胞培养物相比, 特定的细胞类

型的细胞群体已被富集。

以免疫原性形式向脊椎动物注射本发明的细胞可以制得多克隆抗体。以下标准参考资料中描述了单克隆抗体的制备方法: Harrow 和 Lane(1998), 美国专利 4, 491, 632 号、4, 472, 500 号和 4, 444, 887 号, 以及 *Methods in Enzymology* 5 73B:3(1981)。其它可获得特异性抗体分子的方法(最好以单链可变区的形式)包括, 将免疫活性细胞或病毒粒子文库与目标抗原相作用, 使之生长出阳性选择的克隆。参见 Marks 等, *New Eng. J. Med.* 335:730, 1996; 国际专利申请 WO 94/13804, WO 90/02809 以及 McGuiness 等, *Nature Biotechnol.* 14:1449, 1996。用本发明的 pPS 细胞进行阳性选择, 并用带有分布更广的抗原的细胞(如分化的胚胎细胞)或成人衍 10 生干细胞进行阴性选择, 可以获得所需的特异性。这类抗体依次可被用来从混合的细胞群体中鉴别或拯救有所需表型的神经细胞, 诸如在使用组织样品的免疫诊断中进行 costaining, 从终末分化的神经元、神经胶质细胞和其它谱系的细胞中分离前体细胞。

15 基因表达分析

本发明的细胞在鉴别转录物的表达模式和新合成的作为神经前体细胞特征的蛋白质方面也受到关注, 它还可以帮助指导分化途径或促进细胞间的相互作用。已经获得分化的细胞的表达模式, 并将其与对照细胞谱系进行了比较, 如未分化的 pPS 细胞、其它类型的定型前体细胞(如, 向其它谱系分化的 pPS 细胞, 定向为神 20 经元细胞或神经胶质细胞谱系的细胞)、其它类型的假定的神经干细胞(如从神经嵴、神经球(neurosphere)或脊髓)或终末分化细胞(如, 成熟的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、平滑肌细胞以及神经膜细胞)。

对蛋白质水平的表达进行比较的合适方法包括上述免疫测定法或免疫组织化学技术。对转录水平的表达进行比较的合适方法包括 mRNA 的示差显示法(Liang、 25 Peng 等, *Cancer Res.* 52:6966, 1992)、cDNA 文库的整体测序以及阵列表达系统(matrix array expression system)。

Fritz 等, *Science* 288:316, 2000; "Microarray Biochip Technology", L Shi, www.Gene-Chips.com 回顾了微阵列在分析基因表达中的应用。进行微阵列分析的系统 and 试剂可从 Affymetrix 公司, Santa Clara 加利福尼亚州; Gene Logic 30 公司, Columbia 马塞诸塞州; HySeq 公司, Sunnyvale 加利福尼亚州; Molecular Dynamics 公司, Sunnyvale 加利福尼亚州; Nanogen, San Diego 加利福尼亚州; 以及 Synteni 公司, Fremont 加利福尼亚州(Incyte Genomics 授权, Palo Alto

加利福尼亚州)购得。

固相阵列是通过将探针附着在特定位点制造的,或是在所需位点合成探针,或是预先合成探针片段然后再将其附在固体支持物上(美国专利 5,474,895 号和 5,514,785 号)。探针分析通常是在适宜于杂交的条件下使液体(可能含有相关的核苷酸序列)与阵列相作用,然后再检测所形成的杂种。

一种示范方法是用 Genetic Microsystems 阵列发生器和 Axon GenePix™ 扫描仪进行的。制备微阵列的方法是,首先扩增编码待分析标记序列的 cDNA 片段,并将其直接点在玻片上。为比较从两个相关细胞制得的 mRNA,将其一转变成 Cy3 标记的 cDNA,另一个转变成 Cy5 标记的 cDNA。将两种 cDNA 制剂同时置于微阵列片上进行杂交,然后冲洗以除去非特异性的结合。然后在适当的波长下对微阵列片上的各个标记进行扫描,定量所得荧光性,将所得结果格式化以指出阵列上各个标记的 mRNA 的相对丰度。

对表达产物进行鉴定以便用来定性并影响本发明的分化的细胞,这一过程包括,分析第一细胞类型(如,本发明的多能神经元前体细胞,或是能够沿着神经元或神经胶质途径分化的细胞)中的 RNA、蛋白质或其它基因产物的表达水平;然后分析对照细胞类型中同种产物的表达水平;在两种细胞类型间比较相对表达水平,(通常用样品中总的蛋白质或 RNA 进行标准化,或与预计在两种细胞类型中以近似水平表达的其它基因产物进行比较,比如管家基因);然后基于相对表达水平来鉴定相关的产物。

20

药物筛选

本发明的神经前体细胞可用来筛选可影响神经前体细胞及其后代的特征的因素(如,溶剂、小分子药物、肽、多核苷酸)或是环境条件(如培养条件或操作方法)。

在一些应用中,pPS 细胞(未分化的或是分化的)被用来筛选可促进成熟成神经细胞、或在长期培养中促进此类细胞增殖和维持的因素。例如,测试了候选的成熟因子或生长因子,方法是将它们加到不同加样孔内的细胞中,然后检测任何所产生的表型变化,并按所需标准进一步培养和使用这些细胞。

本发明的另一筛选方面的应用涉及测试药物化合物对神经组织或神经传递的作用。筛选得以进行或者是因为这种化合物被设计成对神经细胞有药物作用,或者是因为对该化合物设计的各种作用另外对神经系统具有意料之外的副作用。筛选可用本发明的任何神经前体细胞或终末分化细胞(如,多巴胺能神经元、5-羟色胺能神经元、胆碱能神经元、感觉神经元、运动神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞)

来进行。

读者一般可以参考标准的教科书 “In vitro Methods in Pharmaceutical Research”，学术出版社，1997 以及美国专利 5, 030, 015 号。对候选药物化合物活性的分析通常包括使本发明的分化的细胞与候选化合物结合，或是单独使用，
5 或是与其它药物结合。发明者将细胞形态、标记表型或功能活性上发生的任何变化都归因于化合物(与未处理的细胞或是用惰性化合物处理的细胞进行比较)，然后使化合物的效果与所观察到的变化相关联。

通过分析对细胞生存力、存活率、形态以及特定标记或受体表达情况的影响可以确定第一个例子中的细胞毒性。通过检测 DNA 的合成或修复可以确定药物对染色
10 体 DNA 的作用。 [³H]-胸苷或 BrdU 的参入(尤其是在细胞周期以外的时间，或是超过细胞复制所需的水平)与药物的作用一致。有害的作用还包括界面染色单体交换速度异常，这可通过中期呈现。读者可由参考 A. Vickers (“In vitro Methods in Pharmaceutical Research”，375-410 页，学术出版社，1997)以进一步了解细节。

用任何标准的分析法，在细胞培养物或合适的模型中观察神经细胞的表型或活
15 性，如受体的结合、神经递质的合成、释放或吸收以及神经元前体或鞘磷脂鞘的生长情况，可以确定对细胞功能的影响。

治疗用途

本发明还提供了可在一定程度上修复中枢神经系统(CNS)功能的神经前体细胞，以便供给需要此类治疗的个体(可能是由于先天性功能缺陷、疾病的影响或是损伤的结果)。
20

为确定神经前体细胞对治疗的适用性，可以首先在合适的动物模型中测试这些细胞。在一个水平上，检测了细胞在体内的存活力和维持其表型的能力。在可观察的位置(如脑腔内或脊髓中)向免疫缺陷的动物(如，裸鼠，或因化学物质或辐射而致免疫缺陷的动物)施用神经前体细胞。几天至几个星期或更长的时间后提取其组织，并检测 pPS 衍生细胞是否仍然存在。
25

这可通过施用表达可测标记(如，绿色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶)的细胞来实现，其中细胞被预先标记(例如，用 BrdU 或 [³H]-胸苷)；或是通过随后检测固有细胞标记(例如，用人特异性抗体)来实现。当在啮齿类模型中测试神经前体细胞时，
30 所用细胞的存在情况和表型可通过免疫组织化学的方法或 ELISA(用人特异性抗体)，或用 RT-PCR 分析法(采用特异性扩增人多核苷酸序列的引物和杂交条件)来检测。在本公开还另外提供了可在 mRNA 或蛋白质水平上检测基因表达的标记。

用来检测神经系统功能恢复状况的各种动物模型的描述可参见“*CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances*”，M.H. Tuszynski 和 Kordower 编，学术出版社，1999。

5 本发明的分化的细胞也可用在需要这些细胞的人类患者中，以使组织重建或再生。以允许这些细胞移植或迁移到指定的组织位置、并使功能缺陷区域重建或再生的方式施用这些细胞。

本发明所述的某些的神经祖细胞是为治疗神经系统的急性或慢性损伤而设计的。例如，在包括癫痫、中风、局部缺血、亨特氏症、帕金森氏症以及阿尔茨海默氏症在内的许多症状中都涉及一种刺激毒性。本发明的某些分化的细胞同样适用于治疗髓鞘缺乏症(dysmyelinating disorder)，如家族性脑白质病(Pelizaeus-Merzbacher)、多发性硬化、白质营养不良、神经炎和神经病。适合这些目的是富含少突胶质细胞或少突胶质细胞前体以促进髓鞘重新形成的细胞培养物。

例如，根据被治疗的疾病，神经干细胞被直接移植进中枢神经系统的软组织部位或鞘内部位。用单细胞悬浮液或小的聚集体(密度为每 μL 25,000-500,000个细胞)进行移植(美国专利 5,968,829号)。如 McDonald 等(Nat. Med. 5:1410, 1999)所述，可以在脊髓急性损伤的大鼠模型中测定移植的运动神经元或其前体的效果。在成功的移植中，移植衍生的细胞会在损伤 2-5 周后出现，它们分化成星形胶质细胞、少突胶质细胞和/或神经元，并从损伤的末梢沿着脊髓迁移，并且在离子通道

20 如本发明所述的神经祖细胞和终末分化细胞可以药物组合物的形式对人体施用，其中包括在完全无菌的条件下制得的等渗赋形剂。为了解药物制剂方面的基本原理，读者可以参考 G.Morstyn 和 W.Sheridan 编的 *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*，剑桥大学出版社，1996；以及 *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E.D. Ball, J. Lister 和 P.Law, Churchill Livingstone, 2000。

25 为所需的目的，如重建 CNS 机能以改善某些神经系统异常，这种组合物可以包装在有书面说明的合适容器中。

提供以下实施例以进一步非限制性地阐述本发明的特
殊实施方案

30

实施例

试验过程

这一部分提供了以下实施例中使用的一些技术和试剂的细节内容。

将 hES 细胞保持在原代小鼠胚胎成纤维细胞或是无饲养细胞的系统中。将 hES 细胞以小簇接种在经辐照的小鼠胚胎成纤维细胞中, 或接种在涂有 Matrigel®(以
5 1: 10 至 1: 30 加在培养基中)的平板上。饲养细胞上的 hES 细胞培养物保持在含有 80%KO DMEM(Gibco)和 20%血清替代品(Gibco)的培养基中, 其中添加了 1%非必需氨基酸、1mM 谷氨酰胺、0.1mM β -巯基乙醇和 4ng/mL 人 bFGF(Gibco)。没有饲养细胞的培养物保持在同样的已预先培养了胚胎成纤维细胞进行调节的培养基中, 随后在加入 4ng/mL bFGF(每天更换)。

10 通过连续传代扩增细胞。在 37°C 下用 1mg/mL 的胶原酶处理 ES 集落的单层培养物, 时间为 5-20 分钟。然后小心地从平板上刮取细胞。小心地将小簇细胞分离并重新接种在新鲜的饲养细胞上。

胚状体是用以下方法制造的。在 1mg/mL 的胶原酶中温育 5-20 分钟以获得融合的 hES 细胞的单层培养物, 然后从平板上刮取细胞。然后将细胞分散成簇并涂布在
15 非粘附性细胞培养平板(Costar)上, 培养平板置于含有 80% KO(剔除)DMEM(Gibco)和 20%未加热灭活的 FBS(Hyclone)培养基中, 并添加了 1%非必需氨基酸、1mM 谷氨酰胺和 0.1mM β -巯基乙醇。以 1: 1 或 1: 2 的比例将细胞接种在每个孔(6 孔平板)2mL 的培养基中。每两天在每个孔中另加入 2mL 培养基以培养 EB。当培养基的体积超过 4mL/孔时, 收集 EB 并重新加入新鲜的培养基。悬浮 4-8 天后, 将 EB 分
20 别接种在基质上并使其进一步分化(有选择性分化因子存在)。

向神经前体的分化通常发生在涂有纤连蛋白(Sigma, 在 PBS 中的最终浓度为 20 μ g/mL)的孔中。将 1mL/孔(9.6cm²)的平板在 4°C 下培育过夜或在室温下温育 4 小时。然后除去纤连蛋白, 并在使用前用 PBS 或 KO DMEM 洗涤平板一次。

用以下方法进行 NCAM 和 A2B5 表达的免疫细胞化学检测: 在 37°C 下将或细胞于
25 稀释在含有 1%羊血清的培养基中的一级抗体中温育 15 分钟, 将培养基洗涤一次, 然后再和标记过的二级抗体温育 15 分钟。洗涤后, 将细胞在 2%的多聚甲醛中固定 15-20 分钟。对于其它的标记, 在用 PBS 配制的 4%的多聚甲醛中固定 10-20 分钟, 用 PBS 洗涤三次, 在 100%的乙醇中浸泡 2 分钟, 再用 0.1M PBS 洗涤。再在室温下将培养物在 0.1M 的含有 5%NGS(正常羊血清)的 PBS 封闭溶液中温育至少 1
30 小时。然后在室温下将培养物在稀释于 0.1M PBS(含有 1%NGS)的一级抗体中温育至少 2 小时。然后用 PBS 洗涤, 再在同样的缓冲液中与二级抗体温育 30 分钟。所用抗体列在表 1 中。

表 1: 神经细胞表型标记的抗体

抗体	同型	稀释度	抗原决定簇特异性	来源
5A5	小鼠 IgM	1: 1	聚唾液酸化的 NCAM	发育研究 杂交瘤库
A2B5	小鼠 IgM	1: 1	神经节苷脂	ATCC-CRL1520 克 隆 105
β -微管蛋白	IgG	1: 1000		Sigma T-8660
GFAP	兔多克隆 IgG	1: 500		DAKO 2-334
GalC	小鼠 IgG3	1: 25		Boehringer 1351-621

用以下试剂和设备进行珠免疫淘选: 磁性细胞分离器; Midi MACs™柱; 含有 0.5%BSA 和 2mMEDTA 的 PBS CMF 缓冲液; 抗 NCAM 和 A2B5 的一级抗体; 大鼠抗小鼠 IgG(或 IgM)微珠; 预分离滤器; 大鼠抗小鼠 κ PE; 以及 FACScan 装置。用胰蛋白酶/EDTA(Gibco)收获细胞并将细胞分散。除去胰蛋白酶后, 将细胞重新悬浮在 MACs™缓冲液中。在室温下用一级抗体将细胞标记 6-8 分钟, 并用 MACs™缓冲液洗涤两次(将细胞在 300g 下旋转 10 分钟, 并吸出缓冲液)。然后将每 10^7 个细胞重新悬浮在 80 μ l(微容)。在每 10^7 个细胞中加入 20 μ l(微容)MACs ram™ IgG 微珠, 在 6-12°C 下保持 15 分钟。用 MACs™缓冲液将样品洗涤两次后进行磁分离。将柱子放在磁性细胞分离器中, 将细胞悬浮液加到柱子上(LS+Midi, 保存在约 3-5mL 缓冲液中)。用 3mL MACs™缓冲液洗涤三次以使阴性细胞通过。然后从磁场中取出柱子, 再用 5mL MACs™缓冲液将阳性细胞洗脱。

分离后, 将 A2B5+或 NCAM+的细胞置于涂有聚赖氨酸和昆布氨酸的平板上, 平板涂布在添加有 N2(Gibco 17502-014)、B27(Gibco 17504-010)和所提到的各种因子的 DMEM/F12 (Biowhittaker)中。表 2 中显示了因子的来源。

表 2: 用于神经细胞培养物的因子

生长因子	来源	工作浓度
人 EGF	R&D 系统	10ng/mL
人 bFGF	Gibco	10-25ng/mL
人 CNTF	R&D 系统	1-10ng/mL
人 PDGF	R&D 系统	1ng/mL
人 IGF-1	R&D 系统	1ng/mL

用以下方法对转录水平的表达进行 RT-PCR 分析：用 RNAeasy Kit™(Qiagen)按其说明书上的方法从细胞中提取 RNA。用 DNA 酶消化最终的产物以除去污染性的染色体 DNA。将 RNA 于 37℃ 下在 RNA 卫兵(RNA guard)(Pharmacia Upjohn)和 DNA 酶(Pharmacia Upjohn)中(存在于含有 10mM Tris pH7.5、10mM MgCl₂ 和 5mM DDT 的缓冲液中)温育 30-45 分钟。用苯酚氯仿进行萃取以从样品中除去蛋白质，然后用 3M 醋酸钠和 100% 冰乙醇沉淀 RNA。用 70% 的乙醇洗涤 RNA，空气干燥沉淀物并使其重新悬浮在经 DEPC 处理的水中。

为进行逆转录(RT)反应，使 500ng 的总 RNA 与 1× 第一链缓冲液(Gibco)、200mM DDT 和 25 μg/mL 随机六聚物(Pharmacia Upjohn)混合。在 70℃ 下维持 10 分钟以使 RNA 变性，然后在室温下退火 10 分钟。加入 dNTP 使其最终浓度为 1mM，并加入 0.5 μL Superscript II RT(Gibco)，在 42℃ 下温育 50 分钟，然后在 80℃ 下加热灭活 10 分钟。然后将样品保存在 -20℃ 下直到对它们进行 PCR 分析。用对相关标记特异的引物进行标准的聚合酶链式反应(PCR)，反应在以下反应化合物中进行：cDNA 1.0 μL、10×PCR 缓冲液(Gibco) 2.5 μL、10×MgCl₂ 2.5 μL、2.5mM dNTP 3.0 μL、5 μM 3'-引物 1.0 μL，5 μM 5'-引物 1.0 μL、Taq 0.4 μL 以及 DEPC 水 13.6 μL。

实施例 1: NCAM 阳性细胞

这一试验的目的是确定人胚胎干(hES)细胞是否能够直接分化成 NCAM 阳性的祖细胞。可以从 mEF 支持的培养物或无饲养者的培养物中获得 hES 细胞，然后用含有 20%FBS 的培养基使细胞在悬浮培养物中通过形成胚状体(EB)而分化。然后将 EB 完整地接种在置于 DMEM/F12 培养基(加入了 N2 添加物(Gibco)和 25ng/mL 的人 bFGF)中的纤连蛋白上。培养 2-3 天后，可通过免疫染色鉴定出 NCAM 阳性和 A2B5 阳性的细胞。

在富集 NCAM 阳性细胞时，磁珠分选和免疫淘选都获得了成功。起始的细胞群体中通常含有 25-72%NCAM 阳性的细胞。免疫分离后，NCAM 阳性的比例变成了 43-72%。结果显示在表 3 中。

在 20% 的 FBS 中悬浮保持 4 天以形成胚状体，然后将其接种在 DMEM/F12(添加有 N2 和 B27 添加物和 25ng/mLbFGF)中的纤连蛋白基质上，培养 2-3 天。然后对细胞进行 NCAM 表达的阳性分选，并将细胞保持在含有 CNTF、bFGF 和 NT3 的培养基中。相对于未分选的群体，分选的细胞没有显示出存活率的提高。一些 NCAM 阳性的细胞也表达 β -微管蛋白 III，这说明这些细胞能够形成神经元。它们同时具有神经元细胞的表型特征。这一群体中还有 A2B5 阳性的细胞，这可能是神经胶质祖细胞。然而，很少有细胞是 GFAP(星形胶质细胞的标记)阳性的。尽管细胞群体在培养物中增殖，但几次传代之后，NCAM 阳性细胞(以及可形成神经元的能力)的比例都减小了。

10

实施例 2：A2B5 阳性的细胞

对本试验中的细胞进行了 A2B5 表面标记的免疫选择。在 20% 的 FBS 中 hES 细胞可被诱导形成 EB。悬浮处理 4 天后，将 EB 接种在 DMEM/F12(含有 N2 和 B27 添加物，以及 10ng/mL 人 EGF、10ng/mL 人 bFGF、1ng/mL 人 IGF-1 和 1ng/mL 人 PDGF-AA)中的纤连蛋白上。2-3 天后，25-66% 的细胞表达 A2B5。当通过磁珠分选富集这一群体后，纯度有 48-93%(表 4)。

15

表 4：A2B5 阳性细胞的分化和筛选条件

用于分化的 hES 细胞系	分化培养中 使用的因子	分选方式	对 NCAM 染色呈阳性的细胞		
			分选前	阳性分选	阴性分选
H7 p32 677.004	CFNIP	珠选	25	77	10
H1 p43 677.010	CFNIP	珠选	62	n/a	50
H1 p44 677.012	CFNIP	珠选	56	89	32
H1 p46 677.020	EPFI	珠选	27	48	2
H1 p47 677.032	EPFI	珠选	57	93	30
H9 p40MG 677.038	EPFI	珠选	66	93	41
H9 p42 667.041	EPFI	珠选	27	70	6
缩写因子：			I—胰岛素样生长因子(IGF-1)		
C—睫状神经营养因子(CNTF)			P—血小板衍生生长因子(PDGF)		
F—碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)			T—甲状腺激素 T3		
N—神经营养蛋白 3(NT3)			Ra—视黄酸		
			Fk—毛猴素		

图 2 显示了获得 A2B5 阳性细胞的示范过程。所用缩写：MEF-CM=用小鼠胚胎成

表 3: NCAM 阳性细胞的分化和分选条件

用于分化的 hES 细胞系	分化培养中 使用的因子	分选方式	对 NCAM 染色呈阳性的细胞		
			分选前	阳性分选	阴性分选
H13 p28	CFN	珠选	33	92	41
H13 p28	CFN	淘选	25	n/a	n/a
H9 p32	CFN	淘选	64	72	51
H1 p32	CFN	珠选	27	77	9
H9 p19	CFN	珠选	58	76	32
H9 p31 545.184	CFN	珠选	50	91	67
H1 p40 545.185	CFN	珠筛选 A	65	89	31
H1 p40 545.185	CFN	珠筛选 B	63	81	33
H7NG p28/4 545.187	CFN	珠筛选 A	53	92	45
H7NG p28/4 545.187	CFN	珠筛选 A	72	87	50
H1 p39 545.189	CFNIP	珠选	16	43	6
H7 p32 667.004	CFNIP	珠选	25	73	10
H1 p43 667.010	CFNIP	珠选	47	86	31
H1 p44 667.012	CFNIP	珠选	52	89	34
H1 p46 667.020	EPFI	珠选	60	23	8
H1 p47 667.031	EPFI-EPFI	珠选	53	91	27
H1 p47 667.033	CFN-F	珠选	41	76	24
H9 p40MG 667.038	EPFI	珠选	55	80	25

缩写因子:

C—睫状神经营养因子 (CNTF)	I—胰岛素样生长因子 (IGF-1)
F—碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)	P—血小板衍生生长因子 (PDGF)
N—神经营养蛋白 3 (NT3)	T—甲状腺激素 T3
	Ra—视黄酸
	Fk—毛猴素

在前 10 个试验中, 从分类中回收的 NCAM 阳性细胞被接种在 DMEM/F12 (添加了 N2 和 B27 添加物, 以及 2mg/mL BSA、10ng/mL 人 CNTF、10ng/mL 人 bFGF 和 1ng/mL 人 NT-3) 中的聚 L-赖氨酸/层粘连蛋白上。以后的各项试验中, 细胞被保存在含有

5 N2 和 B27 添加物, 以及 10ng/mL EGF、10ng/mL bFGF、10ng/mL PDGF 和 1ng/mL IGF-1 的 DMEM/F12 中。

图 1(上图)显示了 NCAM 阳性细胞的生长曲线。试验中研究的细胞这样制备的:

纤维细胞培养调节培养基条件：+/-SHH=有或没有 sonic hedgehog；D/F12=DMEM/F12 培养基；N2 和 B27，培养添加物(Gibco)；EPFI=生长因子 EGF、PDGF、bFGF 和 IGF-1；PLL=聚 L-赖氨酸基质；PLL/FN=聚 L-赖氨酸和纤连蛋白基质。

图 1(下图)显示了经分选的 A2B5 阳性细胞的生长曲线。细胞被保持在同样培养基中涂有聚 L-赖氨酸的平板上。当连续传代时细胞增殖。

实施例 3：A2B5 阳性细胞的成熟

通过添加毛猴素 A2B5 阳性的细胞可被诱导分化。对这些细胞可通过不同的培养传代进行评定，如表 5 所示。

表 5：成熟神经细胞的表型特征						
A2B5 分选后的传代数	熟化方法	看到神经元样形态	染色呈阳性的细胞			
			β-微管蛋白	GFAP	GalC	A2B5 NCAM
1	PICNT+Fk 4 天	是	38±9%		13±7%	79±3% 28±6%
3	PICNT+Fk 2 天	是	+++		+	+++++ ++
7	+/-EF +/-血清	是	+	+	++	+++ -
缩写因子：			I—胰岛素样生长因子 (IGF-1) P—血小板衍生生长因子 (PDGF) C—睫状神经营养因子 (CNTF) F—碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) N—神经营养蛋白 3 (NT3)			
			T—甲状腺激素 T3 Ra—视黄酸 Fk—毛猴素			

10

尽管以 A2B5 的表达对细胞进行了分选，此群体被证实不仅能产生少突胶质细胞和星形胶质细胞，而且能产生大比例的神经元。这种结果是出乎意料的：以前认为表达 A2B5 的细胞是神经胶质前体，能产生少突胶质细胞和星形胶质细胞，一而表达 NCAM 的细胞是神经元前体，能产生成熟的神经元。这个试验证实，pPS 细胞能够分化成可在培养物中反复增殖的细胞群体，且能够产生神经元和神经胶质细胞。

15

实施例 4：将分化的细胞移植到哺乳动物脑中

神经前体细胞的移植是用分离自两种 hES 细胞系的细胞完成的：被称为 H1 的

品系, 以及被称为 H7NHG 的遗传转化品系。H7NHG 细胞系带有表达盒(expression cassette), 这使得细胞能够连续表达绿色荧光蛋白(GFP)。

新生 Sprague Dawley 大鼠接受了以下细胞群体之一的单侧纹状体内的植入物:

- 未分化的 hES 细胞
- 5 • 由 hES 细胞衍生的胚状体
- 对 NCAM 表达进行分选的神前体(实施例 1)
- 对 A2B5 表达进行分选的神前体(实施例 2)

对照动物接受了经辐射的小鼠胚胎成纤维细胞的移植物, 其中保存了未分化的 hES 细胞。为确定移植后是否发生细胞增殖, 处死动物 48 小时后, 对一些动物用
10 脉冲经腹膜内注射了 BrdU。移植 14 天后, 向大鼠经心灌注 4% 的多聚甲醛并用免疫组织化学分析法处理组织。

图 3 显示了在施用了表达 GFP 的细胞的动物组织切片上观察到的荧光, 动物被。在所有的移植组中都检测到了存活的细胞。未分化的细胞以大型细胞团存在, 这说明了坏死区域不受控的生长和周围组织的液泡化(左图)。对移植有 HI 细胞的动物
15 进行 AFP 免疫染色, 结果显示未分化的 hES 细胞在移植后转化成了内脏内胚层。胚状体在移植核心中几乎没有迁移, 且同时被坏死区域包围(中图)。相反, 经分选的 NCAM 阳性的细胞以分散细胞的形式出现, 且显示出一定程度的远离植入位置的迁移。

20 实施例 5: 向成熟神经元的分化

为产生终末分化的神经元, 在含或不含 $10\mu\text{M}$ 视黄酸(RA)的 FBS 培养基中胚状体的形成诱导了分化的第一阶段。悬浮 4 天后, 将胚状体接种在置于确定成分培养基(添加了 10ng/mL 人 EGF、 10ng/mL 人 bFGF、 1ng/mL 人 PDGF-AA 和 1ng/mL 人 IGF-1) 中的涂有纤连蛋白的平板上。胚状体附着在平板上, 其细胞开始迁移到塑料表面并
25 形成单细胞层。

3 天后, 可观察到许多有神经元形态的细胞。若细胞对参入的 BrdU 和镶嵌染色呈阳性, 但缺乏谱系特异性分化标记, 就可以确定为是神经前体。若对聚唾液酸化的 NCAM 和 A2B5 呈阳性, 就可以确定假定的神经元祖细胞和神经胶质祖细胞。用流式细胞术计数时, 有 41-60% 的细胞表达 NCAM, 20-66% 表达 A2B5。NCAM 阳性细胞
30 的一个亚群可以表达 β -微管蛋白 III 和 MAP-2。像 GFAP 或 GalC 之类的神经胶质细胞标记没有协同定位。A2B5 阳性的细胞可以产生神经元和神经胶质细胞。A2B5 细胞一个亚群表达 β -微管蛋白 III 或 MAP-2, 而另一个亚群表达 GFAP。一些有神

神经元形态的细胞对 A2B5 和 NCAM 可双重染色。NCAM 阳性和 A2B5 阳性的群体都含有的神经元远远多于神经胶质细胞。

将细胞重新接种在不含促分裂原但含有 10ng/mL 神经营养蛋白-3(NT-3)和 10ng/mL 脑衍生神经营养因子(BDNF)的培养基中, 细胞群体可以进一步分化。大约 5 7 天后可以看到有广泛功能的神经元。与保存在无 RA 环境中的培养物(约 5%)相比较, 保存在视黄酸(RA)中的分离自胚状体的培养物显示出了更多的 MAP-2 阳性的细胞(约 26%)。在碎片中观察到了 GFAP 阳性的细胞。鉴定了 GalC 阳性的细胞, 但这种细胞大且扁平而没有复杂的功能。

表 6 总结了在分化的不同阶段出现的细胞类型和标记。

表 6: 表型标记(免疫细胞化学法)		
未分化的 hES 细胞集落	NCAM 阳性的祖细胞	A2B5 阳性的祖细胞
Tra-1-60 +	Nestin 亚组	Nestin 亚组
Tra-1-81 +	A2B5 亚组	NCAM 亚组
SSEA-4 +	β -微管蛋白 III 亚组	β -微管蛋白 III 亚组
β -微管蛋白 III+ +	MAP-2 亚组	MAP-2 亚组
Nestin -	GFAP -	GFAP 极少
Map-2 -	GalC -	GalC -
神经丝(NF) -	AFP -	AFP -
GFAP -	肌肉特异性肌动蛋白 -	肌肉特异性肌动蛋白 -
GalC -		
甲胎蛋白 -		
肌肉特异性肌动蛋白 -		
NCAM -		
A2B5 -		
神经元	星形胶质细胞	少突胶质细胞
β -微管蛋白 III +	GFAP +	GalC +
MAP-2 +		
神经丝(NF) 亚组		
GABA 亚组		
酪氨酸羟化酶 亚组		
谷氨酸盐 亚组		
甘氨酸 亚组		

同时确定了神经递质的存在。GABA-免疫反应细胞被鉴定可共表达 β -微管蛋白 III 或 MAP2, 并且有神经元细胞的形态学特征。偶尔 GABA 阳性的细胞不共表达神经元标记, 但有星形胶质细胞样的形态。神经元细胞被鉴定可同事表达酪氨酸羟化酶(TH)和 MAP-2。用小泡蛋白抗体染色可以鉴定出突触结构。

- 5 图 4 显示了从 H9 品系的人 ES 细胞中分化出来的培养物中被染色的 TH。将胚状体在 $10\mu\text{M}$ 的视黄酸中保持 4 天, 然后将其接种在涂有纤连蛋白的平板上, 平板在 EGF、碱性 FGF、PDGF 和 IGF 中放置 3 天。然后传代到 N2 培养基(添加了 10ng/mL 的 NT-3 和 10ng/mL 的 BDNF)中的层粘连蛋白上, 并让其继续分化 14 天。在室温下用 2% 的多聚甲醛将分化的细胞固定 20 分钟, 然后对 TH(多巴胺能细胞的标记)使用抗体使之展开。
- 10

实施例 6: 钙成像

- 对钙流进行标准 fura-2 成像被用来研究 hES 细胞衍生的神经元的功能特性。被研究的神经递质包括 GABA、谷氨酸盐(E)、甘氨酸(G)、高浓度的钾(50mM 的 K^+ 替代 5mM 的 K^+)、视黄酸(对照)、多巴胺、乙酰胆碱(ACh)和去甲肾上腺素。溶液在大鼠林格(RR)溶液中含有 0.5mM 的神经递质(但 ATP 的浓度为 $10\mu\text{M}$): 140mM NaCl、 3mM KCl、 1mM MgCl_2 、 2mM CaCl_2 、 10mM HEPES 缓冲液和 10mM 葡萄糖。用 NaOH 将外部溶液的 pH 值调至 7.4。以 $1.2\text{--}1.8\text{mL/分钟}$ 的流速将细胞灌注到记录室中, 用 0.2mL 的注射环(位于浴器入口上游约 0.2mL 处)将溶液作为浴液使用。如果在 60 秒之内钙离子的水平超出基线 10% 并在 1-2 分钟内回到基线的话, 则表明是对钙离子浓度的短暂升高所作出的响应。
- 15
- 20

图 5 显示了神经限制性前体对各种神经递质的反应。图 A 显示了两个不同的盖玻片上分散的细胞的发射值比率。上方用三角标示了所添加的神经递质。

- 图 B 显示了所测细胞响应特定神经递质的频率。图 C 显示了所观察到的对神经递质组合物的响应。在被测的 53 个细胞中, 26 个响应 GABA、乙酰胆碱、ATP 和高浓度的钾。响应其它拮抗剂组合物的群体亚组的数量较少。只有两个细胞对所施加的各种拮抗物都没有响应。
- 25

实施例 7: 电生理学

- 30 对 hES 细胞衍生的神经元使用了标准全细胞膜片钳术, 以记录电压钳模式下产生的离子电流和电流钳模式下产生的动作电位。外部浴液是大鼠林格浴液(实施例 6)。内部溶液是 75mM 的天冬氨酸钾、 50mM KF、 15mM NaCl、 11mM EGTA 和 10mM HEPES

缓冲液, 用 KOH 将 pH 调至 7.2。

所有 6 个被测细胞都表达了钠流和钾流, 并引发了动作电位。当电压从 -70 升至 -80mV 时可测得被动的膜特性, 并有以下数据: 平均电容 (C_m) = 8.97 ± 1.17 pF; 膜电阻 (R_m) = 487.8 ± 42.0 M Ω ; 接触电阻 (R_a) = 23.4 ± 3.62 M Ω 。将细胞置于 -100mV 5 时可测得离子电流, 当电压以 10mV 的增量从 -80 升高至 80mV 时可测得以下数据: 平均钠电流 $I_{Na} = -531.8 \pm 136.4$ pA; 平均钾电流 $I_K = 441.7 \pm 113.1$ pA; I_{Na} (密度) = -57.7 ± 7.78 pA/pF; I_K (密度) = 48.2 ± 10.4 pA/pF。

图 6 显示了典型试验的结果。图 A 显示了在两个细胞(去极化以从 -100mV 的固定电势开始检测 -80 至 80mV 之间的电势)中观察到的钠电流和钾电流。图 B 显示了 10 所观察到的电流-电压关系的输入 (Na^+) 和输出 (K^+) 的峰。钠电流在 -30 和 0mV 之间激发, 在 -10 或 0mV 处达到峰值。钾电流在 -10mV 以上激发, 在 20 和 40mV 之间的数值与钠电流相等或较大。图 C 显示了同一细胞对去极化刺激 n 次响应之后产生的动作电位。将细胞膜置于 -60 和 -100mV 的电压之间(电流为 -80 或 -150pA), 只有短时间的去极化。

15

实施例 8: 由神经祖细胞衍生的多巴胺能细胞

将胚状体在添加了 10 μ M 视黄酸的悬浮液中培养 4 天, 然后置于添加有 EGF、bFGF、PDGF 和 IGF-1 的确定成分培养基中, 培养 3-4 天。然后通过磁珠分选或免疫淘选将细胞分成 A2B5 阳性或 NCAM 阳性富集的群体。

20 经免疫淘选选出的细胞被保持在添加有 10ng/mL NT-3 和 10ng/mL BDNF 的确定成分培养基中。14 天后, 经 NCAM 分选的细胞中有 $25 \pm 4\%$ 是 MAP-2 阳性的一其中 $1.9 \pm 0.8\%$ 是 GABA 阳性的, $3 \pm 1\%$ 是酪氨酸羟化酶 (TH) (多巴胺合成的限制酶, 通常认为可代表合成多巴胺的细胞) 阳性的。

在对 NCAM 进行分选的细胞群体中, NCAM+ve 的细胞不表达神经胶质细胞的标记, 25 如 GFAP 或 GalC。这些数据说明, 可以从 hES 细胞培养物中直接分离含有神经元限制性前体, 而基本上没有神经胶质前体的群体。

另一方面, 对 A2B5 进行筛选的细胞能够产生神经元和星形胶质细胞。富集后, 将细胞置于添加有 NT-3 和 BDNF 的确定成分培养基上, 并使其分化 14 天。涂布后最先的 1-2 天内, 富含 A2B5 的群体中的细胞开始扩增。两周后, 细胞有成熟神经元的形态, 且 $32 \pm 3\%$ 的细胞是 MAP-2 阳性的。重要的是, $3 \pm 1\%$ 的 MAP-2 细胞是 30 TH 阳性的, 而只有 $0.6 \pm 0.3\%$ 具有 GABA 免疫活性。这些数据说明, 可以从 hES 细胞中获得含有星形胶质细胞前体和神经元前体的细胞群体, 包括合成多巴胺的细胞

前体。

用以下方法可进一步获得表达 TH 的神经元。用 H7 品系的第 32 代融合 hES 细胞产生胚状体，方法是将其温育在 1mg/mL 的胶原酶中 (37℃, 5-20 分钟)，从培养皿中刮取细胞，并将细胞置于非粘附性的培养平板 (Costar®) 上。将所得 EB 悬浮培养在含有 FBS 和 10 μM 全反式视黄酸的培养基中。4 天后，收集聚合体并将其置于离心管中。离心处理，吸出上清，将聚合体置于增殖培养基 (DMEM/F12 以 1: 1 添加 N2、半浓度的 B27、10ng/mL EGF (R&D 系统)、10ng/mL bFGF (Gibco)、1ng/mL PDGF-AAA (R&D 系统) 和 1ng/mL IGF-1 (R&D 系统)) 中涂有聚 L-酪氨酸和纤连蛋白的平板上。

10 使 EB 附着并增殖 3 天，然后通过约 1 分钟的胰蛋白酶 (Sigma) 处理收集，并以 1.5×10^5 细胞/孔的浓度接种于放在增殖培养基上的涂有聚 L-赖氨酸和层粘连蛋白的 4 孔室中，培养 1 天。然后将培养基换成神经基础培养基，其中添加了 B27 和以下一种生长混合物：

- 10ng/mL bFGF (Gibco)、10ng/mL BDNF 和 10ng/mL NT-3
- 15 • 10ng/mL bFGF、5000ng/mL sonic hedgehog 和 100ng/mL FGF8b
- 10ng/mL bFGF

将细胞在这些条件下培养 6 天，每两天饲养一次。第 7 天，将培养基换成添加有 B27 和以下一种混合物的神经基础培养基：

- 10ng/mL BDNF、10ng/mL NT-3
- 20 • 1 μM cAMP、200 μM 抗坏血酸
- 1 μM cAMP、200 μM 抗坏血酸、10ng/mL BDNF、10ng/mL NT-3

每两天饲养一次培养物直到第 12 天，此时将其固定并为免疫细胞化学分析进行抗 TH 或 MAP-2 的标记。用 40 倍的物镜分别在三个孔中任选 4 个区域进行计数，以对标记的表达进行定量。

25 结果显示在表 7 中。最初培养在 bFGF、BDNF 和 NT-3 中产生的 TH 阳性细胞的比例最高

表 7: 制造多巴胺能神经元的条件

培养条件		MAP-2 阳性百分比	TH 阳性的 MAP-2 细胞的百分比
1-6 天	6-12 天		
B、N、F	B、N	26%	5.5%
B、N、F	CA、AA	35%	4.0%
B、N、F	CA、AA、B、N	25%	8.7%
F、F8、S	B、N	37%	3.7%
F、F8、S	CA、AA	34%	3.9%
F、F8、S	CA、AA、B、N	21%	5.8%
F	B、N	28%	3.5%
F	CA、AA	26%	4.1%
F	CA、AA、B、N	22%	5.7%
缩写因子:		B—脑衍生神经营养因子(BDNF)	
		S—sonic hedgehog	
F—碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)		CA—cAMP	
F—FGF8		AA—抗坏血酸	
N—神经营养蛋白 3 (NT3)			

对本公开中描述的发明进行某些改进，对精通这一技术领域的技术人员而言，只是常规的优化方式的问题，并且可以在不背离本发明精神，或在附加的权利要求的范围内实施。

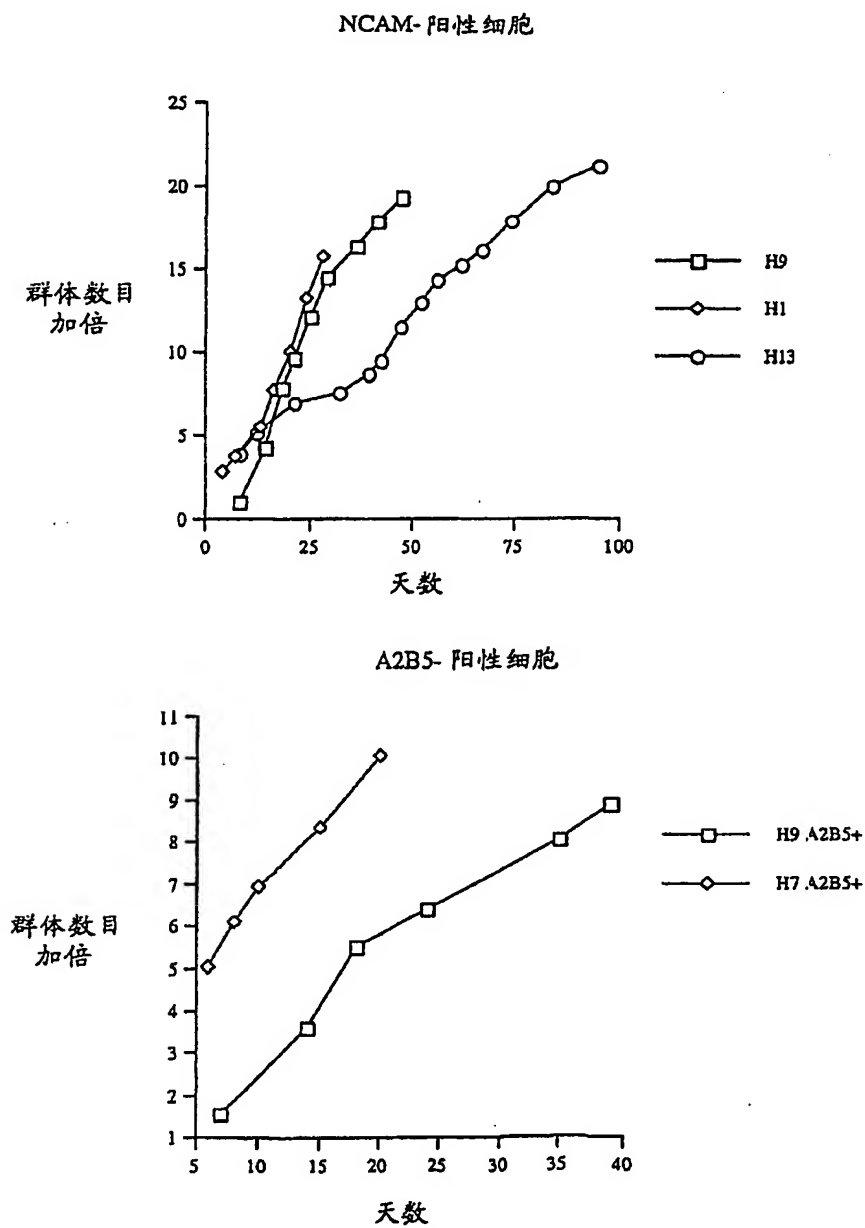


图 1

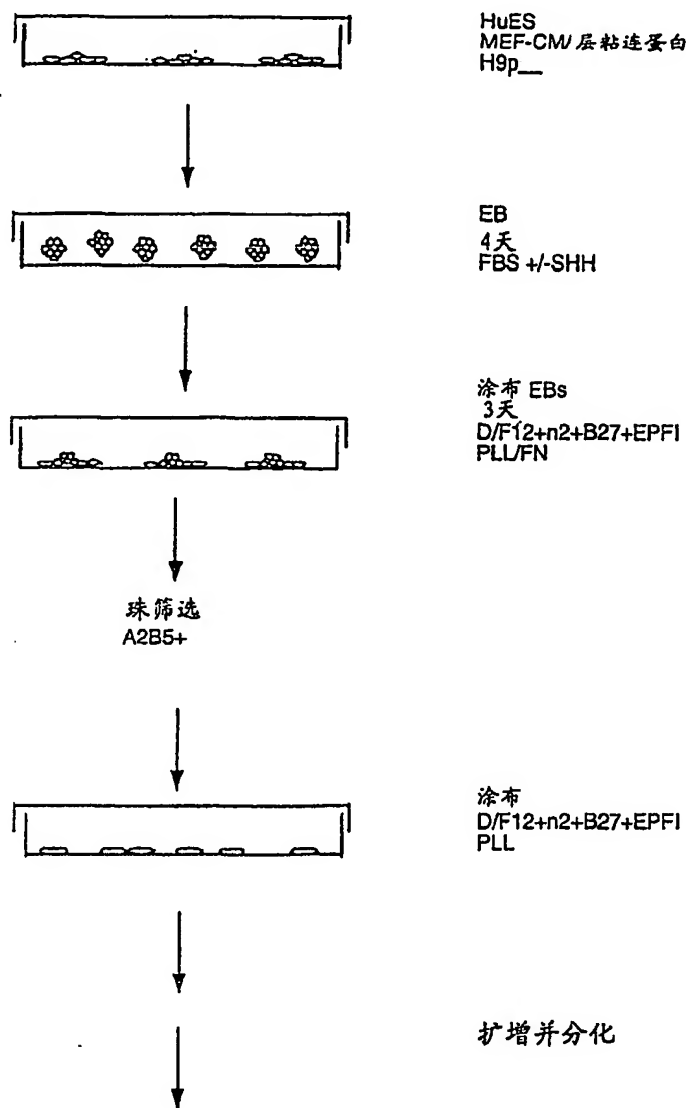


图 2

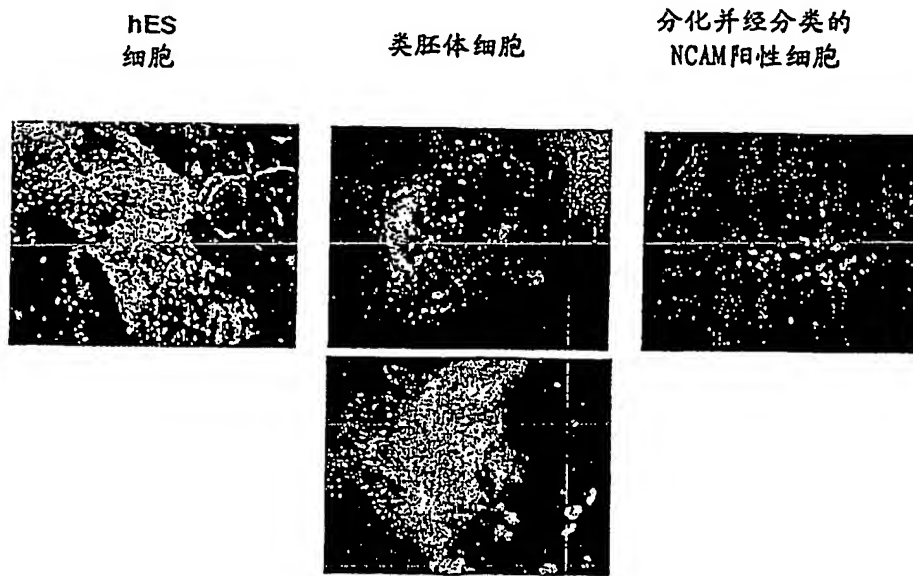


图 3

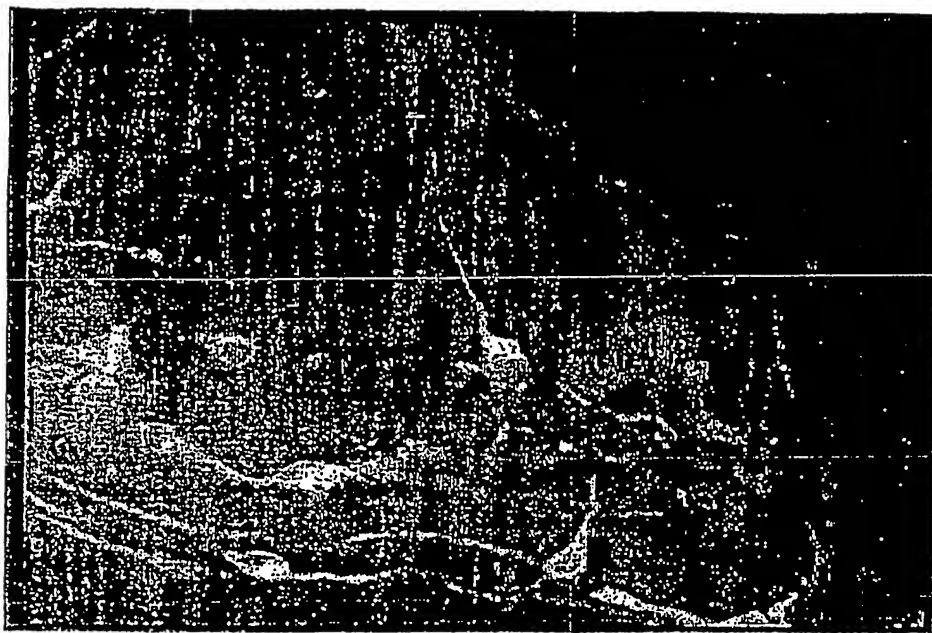


图 4

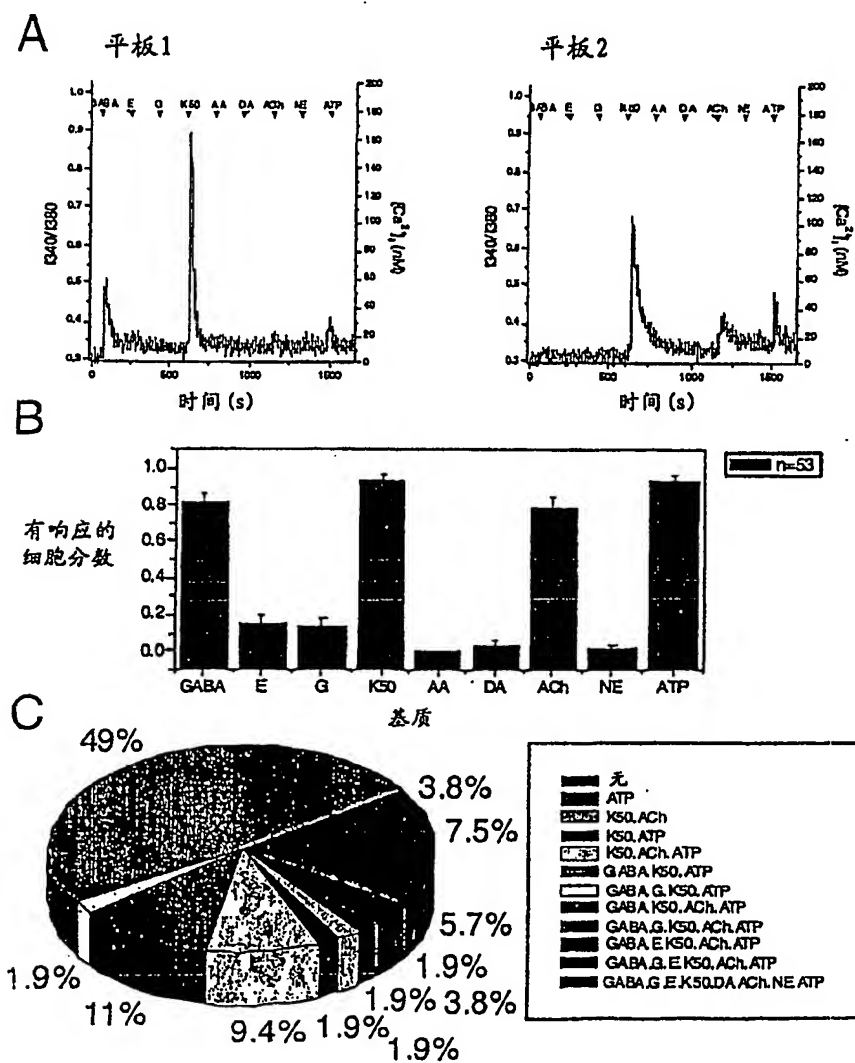
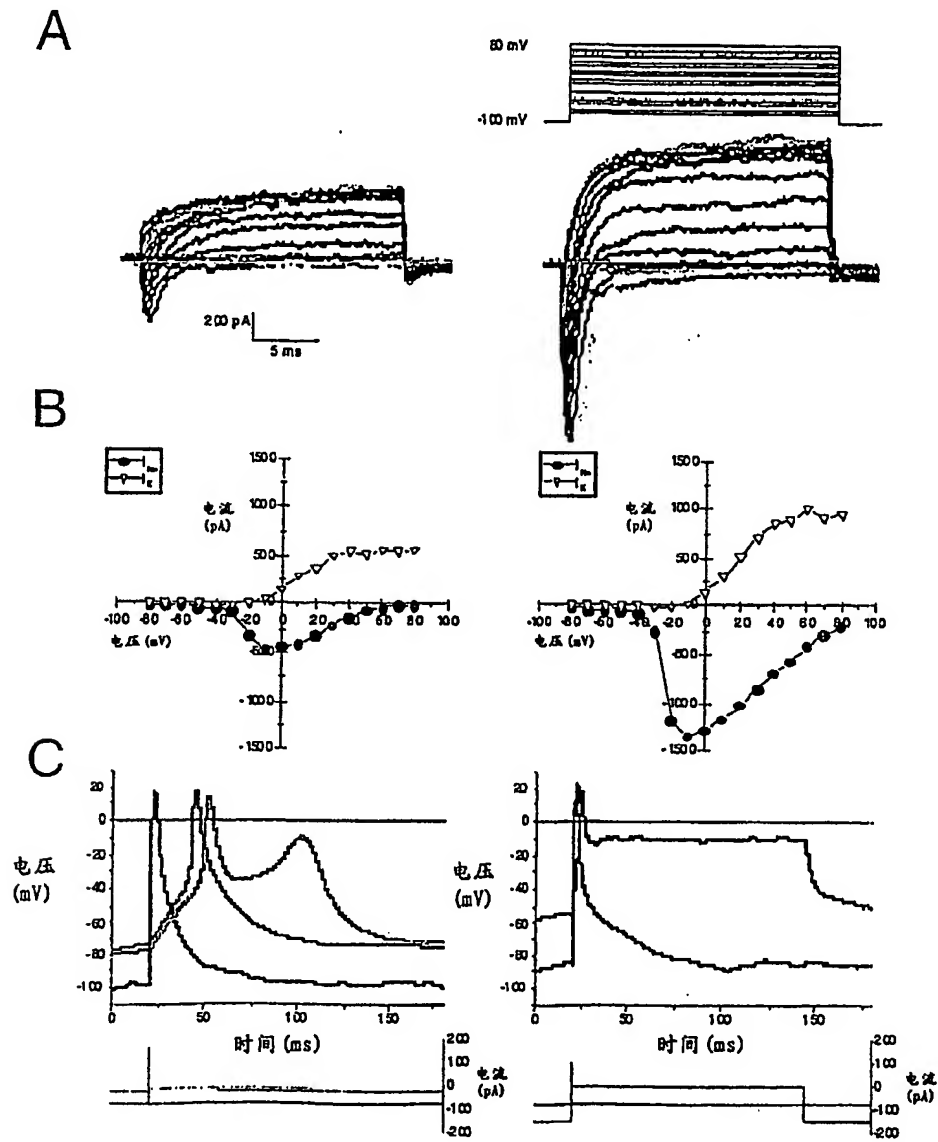


图 5



图

6